

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio del test de detección precoz de displasia epitelial  
OralCDx® en el examen de lesiones orales potencialmente  
malignas: aplicación clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Rocío Díez Pérez**

DIRECTORES

**Antonio Bascones Martinez**  
**Cristina Bascones Ilundain**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología III  
(Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio del test de detección precoz de displasia epitelial  
OralCDx® en el examen de lesiones orales potencialmente  
malignas: Aplicación clínica**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Rocío Díez Pérez**

**Directores**

**Antonio Bascones Martinez  
Cristina Bascones Ilundain**

**Madrid, 2017**

*A mis padres,  
Juan Antonio y Maria Luisa,  
mi inspiración y ejemplo a seguir.  
Os adoro.*

## AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, en primer lugar, agradecer a mis directores de tesis. El profesor Antonio Bascones, quien me ha brindado la oportunidad de acceder al mundo de la investigación y ha insistido siempre en que continúe sin rendirme. La Dra. Cristina Bascones cuya implicación en el presente trabajo ha sido indispensable para poder llevarlo a cabo. Gracias a los dos por vuestro apoyo y dedicación.

Mencionar de forma especial a Rita. De no ser por ella este trabajo no podría haberse realizado. Gracias por compartir tu tiempo, conocimiento, y optimismo conmigo.

A mi familia que nunca ha dejado de creer en mi y sin la que nunca podría haber llegado hasta aquí: mis padres, mis hermanos y mis tíos, en especial Ana y Francisco, ¡no sé qué habría hecho sin vosotros! Gracias por estar a mi lado siempre que os he necesitado. A mis abuelas, Pepita y Lilita, que desgraciadamente ya no están con nosotros, su apoyo y amor incondicional me ha empujado siempre a continuar.

A todos mis amigos por estar ahí en todo momento, comprenderme y animarme a seguir a delante, en particular a Alberto, Amaya, Ana, Bea, Blanca, Marina y Marta. Este trabajo esta dedicado a todos ellos y en especial a Alba y Laura, ánimo campeonas!

A Laurens, por estar a mi lado cada día, ayudarme en todo momento y no dejar que me rinda nunca, siempre con cariño y una sonrisa. *Dank je wel, schat!*

Mi agradecimiento en general a todas las personas que han participado directa e indirectamente en este trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN.....	10
1. Español .....	11
2. Inglés .....	18
II. INTRODUCCIÓN .....	23
1. Lesiones potencialmente malignas .....	24
1.1. Definición .....	24
1.2. Leucoplasia .....	26
1.2.1. Definición .....	26
1.2.2. Epidemiología .....	26
1.2.3. Etiología .....	27
1.2.4. Diagnóstico clínico .....	28
1.2.5. Diagnóstico histológico .....	30
1.2.6. Transformación maligna .....	31
1.2.7. Tratamiento .....	33
1.3. Liquefación oral .....	37
1.3.1. Definición .....	37
1.3.2. Epidemiología .....	39
1.3.3. Etiología .....	39
1.3.4. Diagnóstico clínico .....	39
1.3.5. Diagnóstico histológico .....	40
1.3.6. Transformación maligna .....	41
1.3.7. Tratamiento .....	42
1.4. Eritroplasia .....	44
1.4.1. Definición .....	44
1.4.2. Epidemiología .....	45
1.4.3. Etiología .....	45



1.4.4. Diagnóstico clínico .....	45
1.4.5. Diagnóstico histológico .....	46
1.4.6. Transformación maligna .....	47
1.4.7. Tratamiento .....	47
2. Displasia epitelial .....	49
2.1. Definición .....	49
2.2. Clasificación .....	51
2.3. Diagnóstico diferencial .....	54
2.4. Limitaciones .....	54
3. Biopsia de mucosa oral .....	57
3.1. Definición y consideraciones .....	57
3.2. Técnica .....	58
3.3. Tinción .....	61
3.4. Uso diagnóstico .....	62
4. Biopsia transepitelial por cepillado: Oral CDx® .....	63
5. Justificación e Hipótesis .....	75
6. Objetivos .....	77
 III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	 78
1. Diseño del estudio .....	79
2. Consentimiento del comité ético .....	79
3. Selección de la muestra .....	79
4. Obtención de muestras de tejido .....	81
5. Análisis histopatológico .....	82
6. Variables del estudio .....	85
7. Análisis estadístico .....	87
 IV. RESULTADOS .....	 88
1. Descripción de la muestra .....	89

2. Resultados obtenidos a partir de la biopsia transepitelial por cepillado (Oral CDx®) .....	94
3. Comparación de los resultados obtenidos con ambas técnicas .....	97
V. DISCUSIÓN .....	100
VI. CONCLUSIONES .....	119
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	121
VIII. ANEXO .....	137
1. Aprobación del comité ético .....	138
2. Consentimiento informado del paciente .....	139

## RESUMEN

# **I RESUMEN**

## **1. RESUMEN ESPAÑOL**

Título: Estudio del test de detección precoz de displasia epitelial OralCDx® en el examen de lesiones orales potencialmente malignas: Aplicación clínica.

### Introducción

Se definen como lesiones potencialmente malignas aquellas lesiones que, habiendo sido identificadas inicialmente como *lesiones precancerosas*, se ha podido observar su malignización a lo largo del seguimiento en estudios longitudinales, se ha visto coexistencia en los márgenes de Carcinomas Orales de Células Escamosas (COCE) evidentes, se han detectado alteraciones morfológicas y citológicas similares a las observadas en lesiones epiteliales malignas pero sin haber invadido el tejido conectivo y se han podido identificar algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en carcinomas orales claramente invasivos. De cara a la prevención del cáncer oral, comprender los aspectos clínicos y el comportamiento de las lesiones potencialmente malignas se convierte en una necesidad a la hora de poder detectar casos de forma precoz. Las lesiones orales potencialmente malignas más comunes son leucoplasia, y liquen plano oral (algunos subtipos), y también destaca eritroplasia debido a su alta tasa de malignización.

La displasia epitelial es la alteración definitiva por la cual se considera que el epitelio normal adquiere una situación de enfermedad. Se detecta al microscopio y se considera un factor de riesgo para la transformación maligna. El concepto de displasia epitelial hace referencia al conjunto de alteraciones arquitectónicas (estratificación alterada) y celulares (atipia celular) que sufre el epitelio tendiendo a la malignización. Se ha determinado que a mayor grado de displasia, mayor riesgo de malignización, aunque también malignizan lesiones sin presencia de displasia; y si la presencia de displasia epitelial oral se obser-

va junto a factores como: apariencia clínica no homogénea de la lesión, ausencia de hábito tabáquico del paciente y localización de la lesión en el lateral de la lengua; la tasa de malignización aumentaría hasta un 40%. La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*; WHO) reconoce 5 estadios histopatológicos en lesiones epiteliales de displasia: hiperplasia escamosa, displasia leve, displasia moderada, displasia severa y carcinoma *in situ*.

Como se ha indicado anteriormente, la displasia epitelial es un concepto meramente histológico de forma que para detectarlo es necesario realizar una biopsia. La técnica de referencia, *gold standard*, para la toma de muestras tisulares orales y posterior análisis histopatológico es la biopsia convencional con bisturí. En ocasiones, la indicación para realizar una biopsia es dudosa ya que el aspecto clínico de la lesión no es clínicamente sospechoso, y la decisión para tomar la biopsia depende únicamente en el criterio del profesional. La realización de una biopsia también implica que el paciente contrae una herida que, dependiendo de la profundidad y extensión de la lesión, puede incapacitar al paciente a la hora de hablar o alimentarse. Estas circunstancias se agravan en los casos en los que la lesión tiene múltiples localizaciones y por tanto requiere varias biopsias, o en aquellas lesiones recurrentes que requieren una biopsia en una misma localización.

Oral CDx® (OralScan Laboratories Inc., Suffern, Nueva York) es una prueba de laboratorio indicada para la evaluación de lesiones susceptibles de ser lesiones potencialmente malignas o cáncer oral. Se trata de un método diagnóstico que se realiza en la consulta con el que se toma una biopsia transepitelial por cepillado evitando incisiones y por tanto heridas en la mucosa del paciente. Este tipo de métodos de biopsia por cepillado se han desarrollado de cara a facilitar el diagnóstico precoz de aquellas lesiones en las que no se realizaría una biopsia al no ser clínicamente sospechosas, de forma que supondría un primer nivel diagnóstico no invasivo que podría usar el odontólogo general para detectar lesiones de mayor riesgo para el paciente. Del cepillo se

obtiene una muestra para biopsia suficiente para su análisis con células del estrato superficial, intermedio y basal. La técnica de biopsia por cepillado Oral CDx® está asistida por un programa de ordenador que analiza las muestras tisulares obtenidas con el cepillo transepitelial, cuyas imágenes al microscopio son almacenadas de forma digital y, mediante un procesador de imágenes diseñado especialmente para detectar alteraciones celulares, obtenemos el resultado. Los resultados obtenidos con el sistema Oral CDx® se dividen en cuatro categorías:

- Negativo: No se detecta ninguna evidencia de lesión oral potencialmente maligna o cáncer en el espécimen.
- Positivo: La muestra presenta displasia epitelial indicando una lesión oral potencialmente maligna o cáncer.
- Atípico: Contiene la evidencia definitiva de atipia celular. Ésta puede ser el resultado de una lesión oral potencialmente maligna o cáncer, pero también puede deberse a otras causas como la presencia de inflamación.
- Incompleto: La muestra no permite una interpretación completa. La representación celular incompleta puede ser el resultado de muchos factores que deben analizarse antes de repetir el examen.

Existe controversia en la literatura respecto a la precisión diagnóstica del test OralCDx® en lesiones orales potencialmente malignas. Este tipo de biopsia transepitelial se ha comparado con el test de referencia, biopsia con bisturí, en varios estudios, pero dadas las discrepancias entre los estudios publicados en la literatura en cuanto a población, tipos de lesión analizada, momento de toma de ambas biopsias..., es necesario realizar estudios en los que se analicen lesiones orales potencialmente malignas con ambos tipos de técnicas de biopsia independientemente del resultado de las mismas, y ambas en el mismo momento.

## Objetivo

Realizar un estudio de precisión diagnóstica del test OralCDx® que consiste en una biopsia transepitelial por cepillado, en comparación con la biopsia convencional con bisturí, considerada como el test de referencia, para la detección de displasia epitelial en lesiones orales potencialmente malignas de aspecto clínico benigno.

## Material y métodos

Se seleccionaron pacientes que acudieron al Departamento de Estomatología III: Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, entre febrero 2010 y octubre de 2012, derivados por su odontólogo, y que cumplían con los criterios de inclusión. Todos los pacientes aportaron su consentimiento informado firmado.

Se recogieron los datos socio-demográficos de los pacientes, y los datos clínicos de las lesiones. Los examinadores, expertos en medicina oral y calibrados entre sí para el diagnóstico clínico, tomaron las biopsias bajo anestesia local. El mismo examinador realizó primero la biopsia por cepillado y seguidamente la biopsia convencional con bisturí de forma incisional.

Prueba Índice: Biopsia por cepillado con el OralCDx®. Tomada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada *kit* OralCDx® contiene un cepillo estéril para recoger la muestra, un porta-objetos de cristal con la identificación de la muestra (donde se transfiere el material recogido), un fijador de alcohol y una ficha de datos del paciente. Las muestras fueron enviadas por correo postal a los Laboratorios Inibsa, Barcelona, España. Allí se empleó un sistema asistido por ordenador asociado al OralCDx® para la detección de atipia celular.

Prueba de Referencia: Biopsia convencional con bisturí (incisional) de la misma lesión, que fue realizada justo después de la biopsia por cepillado. El

espécimen fue transportado al laboratorio para el análisis histopatológico por un patólogo de referencia (J.M.A.) ciego a los resultados del test OralCDx®. Once muestras aleatorias fueron analizadas por un segundo patólogo (M.P.G.) durante el estudio para analizar el grado de concordancia inter-examinador para el diagnóstico de displasia. Los resultados incluían el análisis microscópico y el diagnóstico: presencia o ausencia de displasia.

La presencia de displasia epitelial fue considerada como variable principal: Resultado “positivo” o “atípico” con el test OralCDx® y “presencia de displasia” con la biopsia con bisturí. Las variables respuesta secundarias fueron: edad, sexo, hábito tabáquico, consumo de alcohol, color de la lesión, localización de la lesión, tamaño de la lesión, riesgo de malignización, y duración de la lesión.

#### *Análisis Estadístico:*

El análisis estadístico, estadística descriptiva y tablas de contingencia se realizó con el programa SPSS 22.0 para Windows, para el cálculo la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, y cociente de probabilidad positivo y negativo (*Likelihood ratio*). Se calculó el Intervalo de Confianza al 95% para los distintos parámetros.

### Resultados

Se reclutaron en total 36 pacientes de forma consecutiva que cumplieran con los criterios de inclusión. De los 36 pacientes 22 eran mujeres y 14 hombres, en cuanto a la edad, 17 pacientes eran menores de 50 años y 19 de 50 años o mayores. Dieciocho pacientes eran no fumadores y 18 fumadores, de los cuales 11 fumaban más de 20 cigarrillos al día, 4 pacientes fumaban entre 10 y 20, y 3 pacientes fumaban menos de 10 cigarrillos al día.

De las 36 muestras biopsiadas, una por paciente, 26 fueron consideradas lesiones blancas, 1 lesión roja y 9 lesiones con mezcla de color blanco-rojo. El diagnóstico clínico de presunción de las lesiones fue: leucoplasia oral



(21 lesiones) y LPO (15 lesiones). Las distintas localizaciones de las lesiones se agruparon en 3 grupos de acuerdo al tipo de mucosa en el que se encontraron: 11 lesiones en mucosa de revestimiento, 3 lesiones en mucosa especializada, y 22 lesiones en mucosa masticatoria. En cuanto al tamaño, 12 lesiones fueron <5mm, 15 lesiones tenían un tamaño entre 5-10 mm y 9 lesiones medían más de 10mm, una de las cuales superaba los 20mm. Diecinueve lesiones habían sido diagnosticadas en los últimos 6 meses, 8 entre los últimos 6-12 meses y 9 lesiones hacía más de 12 meses. Cuatro de las lesiones se localizaron en el borde lateral de la lengua, y se consideraron de mayor riesgo de malignización.

Los resultados obtenidos con el test OralCDx® fueron 19 casos “negativo”, 17 casos “atípico” y ningún resultado “positivo” o “incompleto”. La tabla de contingencia que compara los resultados del test OralCDx® con la prueba de referencia, mostró 8 verdaderos positivos, 17 verdaderos negativos, 2 falsos negativos y 9 falsos positivos. En total hubo 11 resultados no coincidentes (30.5%) y 25 casos con el mismo diagnóstico con ambas pruebas (69.44%). A partir de la tabla de contingencia se obtuvo para la prueba índice OralCDx® un 80% de sensibilidad, un 65.4% de especificidad, los valores predictivos positivo y negativo fueron 47% y 89.5% respectivamente. Los coeficientes de probabilidad (*Likelihood ratio*) positivo y negativo fueron 2.31 y 0.31 respectivamente. El análisis de concordancia inter-examinador para la detección de displasia tras biopsia con bisturí presentó un índice kappa de 22.5%.

### Conclusiones

1. En el presente estudio se ha observado que mediante el sistema OralCDx® de biopsia por cepillado se detecta presencia de displasia, y que el grado de acuerdo con la biopsia convencional con bisturí es del 69.5%

2. Se ha observado que el sistema OralCDx® puede ser utilizado para detectar displasia epitelial en lesiones orales potencialmente malignas de aspecto clínico no sospechoso.

3. Se ha obtenido una alta sensibilidad, 80%, y un alto valor predictivo negativo, 89.5%, lo que sugiere que el test OralCDx® es efectivo al detectar casos iniciales de displasia como herramienta de *screening* y puede ayudar a seleccionar de forma no invasiva qué casos deberían ser biopsiados con la técnica de referencia.

4. El grado de acuerdo inter-examinador para la detección de “presencia de displasia” tras biopsia con bisturí fue de 22.5%.

## 2. RESUMEN INGLÉS

Title: Analysis of OralCDx® test in the early detection of epithelial dysplasia within the examination of potentially malignant oral lesions: a clinical application.

### Introduction

Potentially malignant oral disorders are defined as areas of tissue with certain alterations in clinical appearances identified at first assessment as “pre-cancerous”, which have undergone malignant change during longitudinal studies follow-up. Some of these alterations, are seen to co-exist at the margins of overt oral squamous cell carcinomas (OSCC) and they may share morphological and cytological changes observed in epithelial malignancies, but without invasion of connective tissue. Some of the chromosomal, genomic and molecular alterations found in clearly invasive oral cancers are also detected in this type of lesions. In order to prevent oral cancer, understanding the clinical aspects and events of these lesions is crucial for early diagnoses. The most common potentially malignant oral disorders are leukoplakia, lichen planus (certain subtypes), and erythroplakia.

Dysplasia is a diagnosis defined by the presence of certain histological and cytological features: a mucosa with epithelial dysplasia has an increased risk of developing into carcinoma when compared to normal mucosa. This risk may increase up to 40% if the lesion has a non-homogeneous clinical aspect, if it is localized in the lateral of the tongue and also if it is diagnosed in a non-smoking patient. The World Health Organization suggests the following classification for dysplasia: hyperplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia and carcinoma *in situ*.

Dysplasia is assessed in the tissue sample by means of a biopsy and the “gold standard” to get tissue samples is the *scalpel biopsy*. If the clinical aspect of the lesion is “not suspicious” the decision to make a biopsy relies on

the expert. After this type of biopsy, the patient has a wound in the mouth that may disrupt the normal eating and talking. Moreover, if the lesion is either widely extended in the oral mucosa, has multiple locations or shows a recurrent pattern, the need of multiple biopsies creates an uncomfortable situation for the patient.

The Oral CDx® *brush biopsy* method is a computer-assisted sample analysis of the cytological smear that detects abnormal cells in all cell layers of the epithelium of the oral mucosa. Brush biopsy is a minimal invasive method by which cells of all epithelial layers are obtained and can be used by general dentists. Oral CDx® brush biopsy can aid in confirming the nature of potentially malignant oral disorders and in revealing those that are precancerous and cancerous when they are not clinically suspected of being so. Tissue samples are stained and analyzed with a neural network-based image processing system which was specifically designed to detect oral precancerous and cancerous cells. The results are classified into four groups:

- Negative: No epithelial abnormality.
- Atypical: Abnormal epithelial changes of uncertain diagnostic significance.
- Positive: Definitive cellular evidence of epithelial dysplasia or carcinoma.
- Inadequate: Incomplete transepithelial biopsy specimen.

There are studies in the scientific literature where OralCDx® brush biopsy has been compared with the scalpel biopsy (gold standard) in order to assess the presence of dysplasia but the results are still unclear. Due to this controversy in the literature, studies comparing both biopsy methods for the same type of lesions at the same moment are needed.

### Objective

The aim of the present study was to evaluate the OralCDx® brush biopsy diagnostic accuracy in comparison with the scalpel biopsy (gold stan-

dard) to detect dysplasia in non suspicious but potentially malignant oral lesions.

### Material and Methods

Patients with an oral lesion that appeared clinically benign were screened between February 2010 and October 2012 at Oral Medicine and Surgery Department in Universidad Complutense of Madrid Dentistry Faculty, and prospectively enrolled in the study according to the inclusion criteria.

Demographic information of each patient was obtained as well as the clinical characteristics of oral lesions. The examiners were calibrated experts in oral medicine, who made the clinical diagnosis and performed both biopsies. Every patient underwent a brush biopsy and then a scalpel biopsy concomitantly during the same visit.

OralCDx® test brush was used to obtain a transepithelial specimen from all patients. The material from the brush was spread on clean and dried glass slides, fixed immediately, and sent for further processing to Inibsa Laboratories (Barcelona, España) where results were determined.

After brush biopsy was performed, the same examiner performed a scalpel biopsy of the lesion in the same location tested with the brush biopsy previously. Samples were sent to a pathologist (J.M.A.) to be independently analyzed from brush biopsy results. Eleven random samples were also analyzed by a second pathologist (M.P.G.) in order to assess inter-examiner concordance for dysplasia diagnosis.

The main variable was presence of epithelial dysplasia: “positive” or “atypical” result with OralCDx® and “presence of dysplasia” after scalpel biopsy. Secondary variables were: age, sex and consumption of tobacco and alcohol. Also color, size and location of the lesion as well as risk for malignization and when the lesion was diagnosed.

Statistical analysis (descriptive analysis and contingency tables) was performed with SPSS Statistics 22.0 program. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratios and confidence intervals were calculated.

## Results

Thirty-six patients (14 male, 22 female) were recruited consecutively who were found to have a non suspicious oral lesion. Seventeen patients were younger than 50 years old and 19 were 50 years old and above. Fifty percent of the patients consumed tobacco and 30% alcohol. Twenty-six out of 36 lesions were white, 1 red and 9 mixed white-red, 21 out of 36 were clinically diagnosed as leukoplakia and 15 as oral lichen planus. Masticatory mucosa was the most common place of involvement: 22 lesions, while 11 lesions were found in the lining mucosa, and 3 in the specialized mucosa. With regards to the size of the lesion: 12 lesions were <5mm, 15 lesions were 5-10 mm and 9 lesions were > 10mm, one of them was 20mm. Nineteen lesions were diagnosed in the last 6 months, 8 between the last 6-12 months and 9 lesions were diagnosed more than 12 months ago. Four lesions were considered as high risk of malignization due to their location: lateral of the tongue.

The results obtained from OralCDx® test were: 19 “negative”, 17 “atypical” and no “positive” nor “inadequate” cases. From the contingency table comparing both biopsy methods showed 8 true positive cases, 17 true negative, 2 false negative and 9 false positive cases. There were 11 non-coincident results (30.5%) and 25 cases with the same diagnosis from both methods (69.44%). The sensitivity was 80%, specificity was 65.4%, positive and negative predictive values were 47% and 89.5% respectively. The positive and ne-

gative likelihood ratios were 2.31 and 0.31. The inter-examiner Kappa concordance analysis for dysplasia pathological assessment was 22.5%.

### Conclusions

1. The OralCDx® brush biopsy test can be used to detect presence of dysplasia and the concordance compared to the scalpel biopsy was 69.5%.

2. The OralCDx® brush biopsy test can be used to detect epithelial dysplasia in non-suspicious potentially malignant oral lesions.

3. Having obtained a sensitivity of 80% and a negative predictive value of 89.5%%, it can be suggested that a) OralCDx® test is effective in screening initial dysplasia lesions b) it can help general dentists to decide which lesions should be biopsied.

4. The inter-examiner agreement for dysplasia pathological assessment was 22.5%.

## INTRODUCCIÓN



## II INTRODUCCIÓN

### 1. LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS

#### 1.1. Definición:

La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*; WHO) celebró un *workshop* en 2005 donde se discutió la diferente terminología, las definiciones y las clasificaciones previas de las lesiones orales con predisposición a una transformación maligna. Para evitar la confusión con la distinta nomenclatura existente (pre-cáncer, lesiones precursoras de cáncer o premalignas...) se concluyó que el término adecuado era “lesiones potencialmente malignas” (Warnakulasuriya et al., 2007). Estas lesiones se definen como aquellas que, habiendo sido identificadas inicialmente como *lesiones precancerosas*, se ha podido observar su malignización a lo largo del seguimiento en estudios longitudinales, se ha visto coexistencia en los márgenes de Carcinomas Orales de Células Escamosas (COCE) evidentes, se han detectado alteraciones morfológicas y citológicas similares a las observadas en lesiones epiteliales malignas pero sin haber invadido el tejido conectivo y se han podido identificar algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en carcinomas orales claramente invasivos. Dentro de este concepto quedarían incluidas todas las presentaciones clínicas que conllevan riesgo de malignizarse, unificando de esta manera en un solo grupo las lesiones y condiciones precancerosas.

Desde la perspectiva del desarrollo del cáncer oral, se convierte en una necesidad comprender los aspectos clínicos y el comportamiento de las lesiones potencialmente malignas. La WHO ha determinado que en las próximas décadas la tasa de pacientes con cáncer oral se verá aumentada a nivel mundial. El cáncer de cabeza y cuello más común es el carcinoma oral de células escamosas (COCE), excluyendo las glándulas salivales mayores y los senos

nasal y paranasal; de hecho si de todos los cánceres de cabeza y cuello los carcinomas representan el 98.1%, de ellos el 90% son COCE. Existe gran variabilidad en la prevalencia de COCE en las distintas áreas geográficas debido a las distintas características socio-culturales, diferencias étnicas en cuanto a factores de riesgo, así como la recolección de datos, y el nivel de desarrollo de los servicios de salud (Warnakulasuriya, 2009). En España, según los datos recogidos en 2012 por la Sociedad Española de Oncología, la incidencia de cáncer oral es 1.9%, la mortalidad es 1.1% y la prevalencia estimada a 5 años es 2% (SEOM, 2012).

Las lesiones orales potencialmente malignas más comunes son leucoplasia, liquen plano (algunos subtipos), eritroplasia y fibrosis oral submucosa (Panwar et al., 2014). Según el estudio de Phookan y cols. realizado en 320 pacientes, la presencia de lesiones potencialmente malignas se dio en 70 pacientes, y de ellos en el 20.65% se diagnosticó leucoplasia, mientras que tanto el liquen plano oral como la fibrosis oral submucosa fueron detectados tan solo en el 0.62% de los pacientes (Phookan y Saikia, 1998). Isaac y cols. investigaron la fibrosis oral submucosa y observaron diversas alteraciones tales como: atrofia, despigmentación, ulceración con tejido de granulación, hiperplasia y displasia en un 74.3%, 62.8%, 40%, 25.7% y 8.6% respectivamente. No se diagnosticó ningún carcinoma en ninguno de los casos, deduciendo que la tasa de malignización es reducida en este tipo de lesiones (Isaac et al., 2008).

La detección precoz de las lesiones orales potencialmente malignas, y por tanto de cáncer oral, es de gran importancia, y se han propuesto para ello una gran diversidad de métodos diagnósticos: examen oral, medios de tinción directa, citología oral, espectroscopía, tomografía, espectroscopía fluorescente... (Steele y Meyers, 2011). A su vez, de cara a un diagnóstico precoz de estas lesiones, algunos criterios deben ser tenidos en cuenta:

1. Presencia o no de sintomatología en lesiones persistentes de la cavidad oral.
2. Tabaco, tabaco de mascar, consumo de alcohol, infección por virus del papiloma humano (VPH), drogadicción...
3. Edad avanzada.
4. Inmunosuficiencia.
5. Antecedentes genéticos.
6. Mal control de la higiene oral.

## **1.2. Leucoplasia**

### **1.2.1. Definición:**

El nombre leucoplasia procede de las palabras griegas “leuco”, blanco, y “plakos”, placa; y se define como “placas blancas con riesgo de malignización cuestionable habiendo excluido otras enfermedades o alteraciones conocidas que no conlleven un riesgo aumentado de cáncer” (van der Waal, 2009). Dentro del grupo de enfermedades de la mucosa oral que no conlleven un riesgo aumentado de malignización podemos encontrar: quemadura por aspirina, candidiasis pseudomembranosa, candidiasis hiperplásica, lesión friccional, leucoplasia vellosa, leucoedema, línea alba, lupus eritematoso, *morsicatio buccarum*, papiloma y lesiones relacionadas, sífilis secundaria, lesiones inducidas por tabaco, estomatitis nicotínica y nevus blanco esponjoso (van der Waal, 2010).

### **1.2.2. Epidemiología:**

La prevalencia mundial de la leucoplasia oral es de entre 0.5-3.4%, aunque en estudios realizados en los últimos años se muestran prevalencias de leucoplasias de entre 1.1-11,7%, con un valor medio de 2.9% (Banoczy et al.,

2001). En la revisión sistemática llevada a cabo por Petti y cols., la prevalencia mundial de la leucoplasia oral es del 2.6%, aunque entre los estudios se apreció un alto grado de heterogeneidad (Petti, 2003).

Las lesiones de leucoplasia pueden aparecer a cualquier edad pero la prevalencia es mayor en individuos mayores de 40 años (Greer, 2006). En los países desarrollados, las leucoplasias suelen encontrarse en personas de mediana edad, sobre todo entre la cuarta y séptima década de la vida, mientras que en los países en desarrollo, suelen detectarse de 5 a 10 años antes. En relación con el sexo, se confirma que la leucoplasia afecta a los hombres al menos tres veces más que a las mujeres sin que se encuentren diferencias geográficas, lo que se atribuye al consumo global de tabaco y alcohol (Petti, 2003). Existe una mayor presencia de leucoplasia en pacientes fumadores comparado con no fumadores: 6 veces más (van der Waal, 2009).

### 1.2.3. Etiología:

El tabaco es el principal factor predisponente para el desarrollo de leucoplasia, aunque existe una proporción de lesiones no asociadas a alguna causa conocida. La frecuencia del consumo de tabaco aumenta la probabilidad de desarrollo de leucoplasia. En los países en desarrollo, la mayoría de las leucoplasias se asocian al tabaco ó a la nuez de areca (*betel quid, gutka*), de forma independiente ó combinados. En los países desarrollados, la mayoría de las leucoplasias también se asocian con el hábito tabáquico. La forma de consumo del tabaco influye en la distribución de las lesiones:

- Fumar invertido: lesiones en el paladar duro
- Tabaco mascado: lesiones en la zona de depósito del tabaco
- Puros: lesiones en el suelo de la boca
- Cigarrillos: lesiones en la mucosa bucal y en las comisuras.

El establecimiento de un factor etiológico para una lesión blanquecina excluye el diagnóstico de leucoplasia, excepto en el caso del tabaco. La influencia del tabaco se confirma con la desaparición de las lesiones tras el cese del hábito, aunque muchas veces la leucoplasia persiste (Napier y Speight, 2008).

Al contrario que en relación al COCE, el alcohol muestra resultados contradictorios al plantearse como factor de riesgo para la aparición de leucoplasia, aunque tendría un efecto sinérgico al combinarse con tabaco (Napier y Speight, 2008).

Las infecciones por *Cándida*, virus del papiloma humano y el virus de Epstein Barr son co-factores que pueden modificar el pronóstico evolutivo de la leucoplasia ya establecida, así como en el caso de pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o pacientes transplantados (van der Waal, 2009). Cabe destacar en relación a la infección por *Candida*, que se han aislado especies productoras de nitrosaminas (otras distintas del subtipo *albicans*) en lesiones de leucoplasia no homogéneas con displasia, y se ha demostrado que el tratamiento de la infección produce una variación de la lesión pasando a transformarse en una leucoplasia homogénea (Martorell-Calatayud et al., 2009). Por otro lado, aunque existe una asociación establecida entre la infección por el virus del papiloma humano, concretamente los subtipos 16 y 18, con el carcinoma de cervix; en los estudios de los últimos años se ha sugerido que los subtipos distintos al 16 y 18 asociados a COCE están asociados a una menor supervivencia del paciente (Mazul et al., 2016).

#### 1.2.4. Diagnóstico clínico:

Las lesiones de leucoplasia pueden aparecer en cualquier localización de la mucosa oral y orofaríngea y clínicamente puede ser dividida en dos grupos distintos: homogéneas y no homogéneas (van der Waal, 2009). Las lesiones

nes homogéneas presentan una superficie uniformemente lisa, delgada y con hendiduras superficiales en la superficie de queratina (figura 1) (Warnakulasuriya et al., 2007, van der Waal, 2009). Las lesiones de leucoplasia no homogéneas presentan un color blanco-rojo, conocidas como eritroleucoplasia, que sigue un patrón irregular “a trazos” o nodular (figura 2). La leucoplasia verrucosa proliferativa es un subtipo de leucoplasia perteneciente a las no homogéneas que fue descrita por Hansen por primera vez en 1985 y destaca por tener una morfología elevada, un alto grado de potencial de malignización, y ser, a su vez, resistente al tratamiento (van der Waal, 2010). Se presenta clínicamente como múltiples leucoplasias simultáneas, multifocales que cubren una amplia área de la mucosa oral (figura 3). La secuencia clínica que suele seguir la leucoplasia verrucosa proliferativa es desde una simple hiperqueratosis hasta una hiperplasia verrugosa, carcinoma verrugoso y COCE (van der Waal, 2009).

A la hora de describir la leucoplasia de forma clínica, también se debe dar información sobre la localización en la cavidad oral, así como el tamaño y extensión.

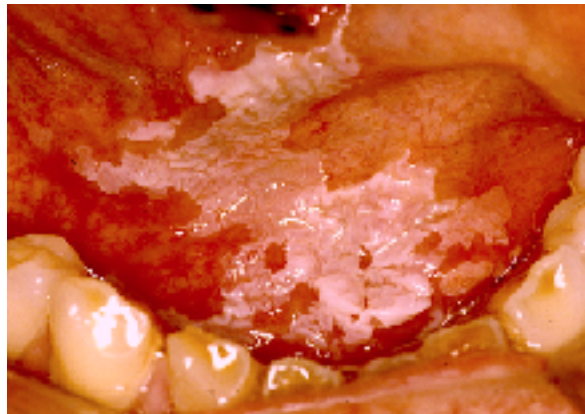


Figura 1: Leucoplasia homogénea (Imagen cedida por la Dra. Bascones-Ilundain).



Figura 2: Eritroleucoplasia (Imagen cedida por el Dr. Bascones-Martinez).

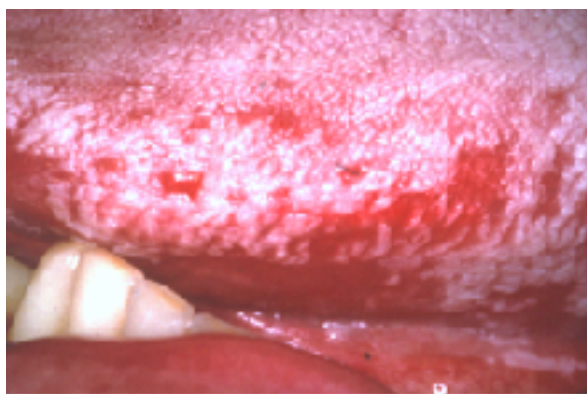


Figura 3: Leucoplasia verrucosa proliferativa (Imagen cedida por el Dr. Bascones-Martinez).

#### 1.2.5. Diagnóstico histológico:

Histológicamente también podemos dividir las lesiones de leucoplasia en 2 tipos: con displasia y sin displasia; aunque los hallazgos histológicos más frecuentes descritos en la leucoplasia son la hiperqueratosis moderada y la hiperplasia epitelial sin displasia (Martorell-Calatayud et al., 2009). La presencia de displasia es el indicador más importante de potencial de malignización, es un hallazgo puramente histológico que no se aprecia a nivel clínico y viene determinado por el grado de alteración de la arquitectura del epitelio acompañado del grado de atipia celular.

El diagnóstico de leucoplasia se puede realizar con distintos niveles de certeza (factor C), tanto desde el punto de vista clínico (C1 y C2) como a nivel clínico e histopatológico (C3 y C4), como se muestra en la tabla 1.

C1	Diagnóstico de una sola visita, examen y palpación. Diagnóstico provisional clínico
C2	Diagnóstico obtenido tras eliminar posibles factores etiológicos y tras comprobar la persistencia de la lesión tras 2-4 semanas. Diagnóstico clínico definitivo.
C3	Diagnóstico clínico C2 complementado con una biopsia incisional. Diagnóstico histopatológico provisional.
C4	Diagnóstico histopatológico de la lesión completa tras la excisión/resección de la lesión. Diagnóstico histopatológico definitivo.

Tabla 1: Niveles de certeza en el diagnóstico de leucoplasia (van der Waal, 2009).

#### 1.2.6. Transformación maligna:

La tasa de malignización de las lesiones de leucoplasia es aproximadamente del 1%, no obstante hay también una gran diferencia entre las distintas poblaciones para esta tasa de malignidad pudiendo variar entre 0.13-17.5% (Panwar et al., 2014). Según la revisión de Petti y cols., la tasa de malignización de la leucoplasia sería del 1.36% al año (Petti, 2003). Esta tasa de malignización es mucho mayor en aquellas lesiones de leucoplasia diagnosticadas como no-homogéneas, sobre todo cuando existe algún grado de displasia, destacando la leucoplasia verrucosa proliferativa (Holmstrup et al., 2006), cuya tasa de malignización se ha observado entre el 40-100% en estudios con seguimiento a 4.4 y 11.6 años (Silverman y Gorsky, 1997, Bagán et al., 2003, Abadie et al., 2015).



Dado que el tipo de leucoplasia más agresivo y con mayor riesgo de transformación maligna en la leucoplasia verrucosa proliferativa, su correcto diagnóstico es crucial, y algunos autores han propuesto una serie de criterios, cinco mayores y cuatro menores, basándose en estudios de los últimos años que combinados ayudan a realizar un correcto diagnóstico (Cerero-Lapiedra et al, 2010):

Criterios Mayores: (MC)

- A. Lesión de leucoplasia con más de dos localizaciones, encontrada con mayor frecuencia en encía, proceso alveolar o paladar.
- B. Existencia de un área verrucosa.
- C. La lesión ha sufrido un engrosamiento o aumentado su extensión durante su desarrollo.
- D. Se ha observado recurrencia tras el tratamiento.
- E. Desde el punto de vista histológico, puede darse una hiperqueratosis epitelial, hiperplasia verrucosa, carcinoma verrucosos o carcinoma, bien *in situ* o infiltrativo.

Criterios menores: (mc)

- a. La lesión de leucoplasia ocupa al menos 3cm al sumar todas las áreas afectadas.
- b. Sexo femenino.
- c. Paciente no fumador.
- d. Evolución de la lesión más de 5 años.

De cara a diagnosticar una leucoplasia verrucosa proliferativa, los autores sugieren la combinación de los criterios de la siguiente manera:

1. Tres criterios mayores (incluyendo E), o
2. Dos criterios mayores (incluyendo E) + dos criterios menores.

Se han asociado con un mayor riesgo de malignización de lesiones de leucoplasia los siguientes factores: sexo femenino, persistencia de la lesión, presencia de la lesión en paciente no fumador, localización en lateral de la lengua o suelo de la boca, tamaño superior a 200mm<sup>2</sup>, tipo no homogéneo, presencia de *Candida albicans*, presencia de displasia epitelial (van der Waal, 2009, Yarmdici et al., 2014). En relación al riesgo de malignización de las leucoplasias en el suelo de la boca, la hipótesis más generalizada habla de la tendencia de cualquier carcinógeno potencial para acumularse en ese área. También habría que tener en cuenta que la parte inferior de la boca es de origen endodérmico en vez de ectodérmico como la mayor parte del epitelio oral y esta diferencia podría influir en el riesgo de malignización (Kramer, 1980). En cuanto al hábito tabáquico, no se sabe muy bien por qué aunque su presencia se asocia con mayor prevalencia de lesiones de leucoplasia, su ausencia se asocia con un mayor riesgo de transformación maligna. Se especula que en ausencia del tabaco existen otros factores de mayor importancia en el inicio ó la promoción de la carcinogénesis (van der Waal, 2009).

Por otro lado, es llamativo el dato relacionado con la presencia de leucoplasia en pacientes con lesiones diagnosticadas como COCE, ya que aquellos que presentaban leucoplasia mostraban a su vez COCE en estadios menos avanzados que los que no presentaban leucoplasias (Haya-Fernandez et al., 2004).

#### 1.2.7. Tratamiento:

A la hora de tratar las lesiones de leucoplasia se debe realizar primero un diagnóstico diferencial de las posibles lesiones blancas que puedan producirse debido a distintas enfermedades o condiciones de la mucosa oral así como quemadura por aspirina, otras quemaduras, candidiasis pseudomembranosa, lesiones traumáticas, línea alba, *morsicatio buccarum*, papiloma, parches en sífilis secundaria, lesiones producidas por tabaco, paladar de fumador (es-

tomatitis nicotínica), nevus blanco esponjoso, liquen plano oral, reacción liquenoide... (Van der Waal, 2009, Warnakulasuriya et al., 2007).

Una vez descartados otros diagnósticos, se recomienda un periodo de observación de entre 2-6 semanas por si la lesión revierte por si sola. Si la lesión persiste, se debería tomar una muestra y realizar un diagnóstico histopatológico, estudiando también si hay presencia de displasia. En los casos en los que la lesión es multifocal, se recomienda la toma de una serie de muestras de las distintas localizaciones (*mapping*) para abordar toda la extensión de la lesión.

A la hora de tomar una biopsia los métodos de tinción en boca como el azul de metileno pueden ayudar a identificar la lesión antes de proceder a la incisión. Esta tinción tiene una alta sensibilidad y precisión para detectar lesiones de leucoplasia. Chen y cols, realizaron un estudio en 58 pacientes y observaron una alta sensibilidad y precisión, 90% y 79% respectivamente. También obtuvieron una especificidad de 69%, un valor predictivo positivo de 74% y negativo de 87% (Chen et al., 2007). El uso de test genéticos no invasivos, marcadores moleculares en saliva, técnicas de biopsia transepitelial por cepillado, podrían ser técnicas utilizadas a la hora de confirmar el diagnóstico, y señalar aquellas lesiones que dadas sus características, tienen mayor riesgo de malignizarse.

En relación al tratamiento, el objetivo primario debe ser prevenir la transformación maligna y los objetivos secundarios lograr la resolución clínica y la modificación histológica.

Se debe recomendar la excisión de la lesión siempre que se observe displasia moderada o severa ya que existe riesgo de malignización. Las opcio-

nes de tratamiento disponibles se pueden dividir en quirúrgicas y no quirúrgicas:

Dentro de las quirúrgicas están la escisión quirúrgica (biopsia excisional con bisturí), laser de CO<sub>2</sub>, electrocauterización y crioterapia. El método más común es la escisión quirúrgica (biopsia con bisturí) o el laser de CO<sub>2</sub>. En las lesiones que están muy extendidas se deben considerar técnicas como la crioterapia (van der Waal, 2009).

Las opciones no quirúrgicas están destinadas a prevenir la transformación maligna de la leucoplasia. El uso de vitamina A, C y K ha sido investigado así como los beta-carotenos y la terapia fotodinámica, también útil en lesiones muy extendidas, observándose una respuesta favorable en algunos casos de leucoplasia (Lin et al., 2010). No debemos olvidar que la leucoplasia es en muchas ocasiones una lesión que puede recidivar y requiere un seguimiento. En este sentido cabe destacar el artículo de Holmstrup y cols., donde a partir del análisis retrospectivo de 254 leucoplasias homogéneas y no homogéneas tratadas o no con cirugía y con un seguimiento de 1,5 a 18,6 años obtuvieron una *odds ratio* OR=7 para lesiones no homogéneas y una OR=5.4 para un tamaño mayor de 200mm<sup>2</sup> y malignización de la lesión (Holmstrup et al., 2006).

Lodi y cols. realizaron una revisión sistemática para tratar de analizar cuál de los tratamientos de la leucoplasia oral es el más efectivo a la hora de, principalmente, prevenir la malignización. De los nueve estudios incluidos, ninguno hacía referencia al tratamiento quirúrgico. Concluyen que a pesar de que hay tratamientos que resultan efectivos a la hora de eliminar la lesión, no existe un tratamiento que haya demostrado efectividad a la hora de prevenir la transformación maligna de la leucoplasia o de evitar su recidiva (Lodi et al., 2006). La recidiva de las leucoplasias puede producirse en la misma localización o en otra distinta, en ese caso algunos autores consideran que la nueva

lesión debería considerarse como una nueva leucoplasia, pero esta recidiva en una localización distinta también podría estar relacionada con las alteraciones histopatológicas que persisten en los márgenes de la lesión, no visibles clínicamente (van der Waal, 2009).

Para adoptar la actitud terapéutica más precisa se han definido dos grupos de riesgo (Martorell-Calatayud et al., 2009):

1. Grupo de *bajo riesgo de malignización*, formado por aquellas leucoplasias con ausencia de displasia y aquellas que presentan displasia leve, y se localizan en áreas de bajo riesgo ó de tamaño menor a 200mm<sup>2</sup> ó se presentan clínicamente como una leucoplasia homogénea. En este grupo se puede hacer un control periódico del paciente con un intervalo de visitas que no supere los 12 meses, tratar las lesiones con retinoides tópicos u orales, aunque no han dado resultados suficientemente eficaces y tratar las lesiones con técnicas ablativas no quirúrgicas, tales como la crioterapia y la vaporización con láser de CO<sub>2</sub>.

2. Grupo de *alto riesgo de transformación maligna*, formado por aquellas leucoplasias con displasia leve localizadas en zonas de alto riesgo ó tamaño mayor a 200mm<sup>2</sup> de espesor ó asociadas a una forma clínica heterogénea, las leucoplasias con displasia moderada ó grave y las leucoplasias verrugosas. En este grupo está justificado el tratamiento agresivo quirúrgico consistente en la resección de todo el espesor de la mucosa en la que esté presente la leucoplasia.

Dado el alto riesgo de recurrencia y de desarrollo de cáncer de cabeza y cuello a distancia del foco leucoplásico primario, estos pacientes deben ser seguidos durante el resto de su vida a intervalos regulares que pueden variar de entre 3 a 6 meses en aquellos pacientes considerados de alto riesgo, y de entre 6 a 12 meses en aquellos pacientes considerados de bajo riesgo.

### **1.3. Liquen plano oral**

#### **1.3.1. Definición:**

El liquen plano fue descrito por primera vez por Erasmus Wilson en 1869 y se define como una enfermedad crónica, autoinmune e inflamatoria que afecta a piel, mucosa oral, cuero cabelludo y uñas. El liquen plano oral (LPO) es una enfermedad mucocutánea crónica, de carácter inflamatorio, etiología desconocida y naturaleza autoinmune, en la que se produce una agresión mediada por linfocitos T dirigida contra las células basales del epitelio de la mucosa oral (Walsh et al., 1990).

El LPO se presenta normalmente en la mucosa oral de forma amplia y simétrica aunque también puede encontrarse en la lengua y la encía. Existen seis subtipos de LPO que pueden presentarse de forma aislada o combinada: reticular, en placa, papular, atrófico, erosivo y bulloso. (Farhi y Dupin, 2010). El liquen plano reticular es el más común y normalmente presenta lesiones de color blanco-gris, normalmente simétricas y con un patrón estriado denominado estrías de Wickham (figura 4). Los tipos erosivo y atrófico (figura 5) normalmente presentan sintomatología y requieren confirmación histopatológica del diagnóstico (Al-Hashimi et al., 2007).

Cuando el LPO aparece en la encía se denomina gingivitis descamativa. Esta forma se caracteriza por la presencia de ulceraciones del epitelio sobre una mucosa atrófica, aunque también podría presentarse como forma ampollosa (Bascones-Ilundain et al., 2006).

El LPO debe diferenciarse de las reacciones liquenoides. Estas son lesiones compatibles con LPO tanto a nivel clínico como histopatológico, pero se producen como reacción a agentes específicos como restauraciones metáli-

cas, resinas, reacciones o hipersensibilidad a medicamentos, permitiendo al clínico establecer una relación causa-efecto (van der Meij y van der Waal, 2003).

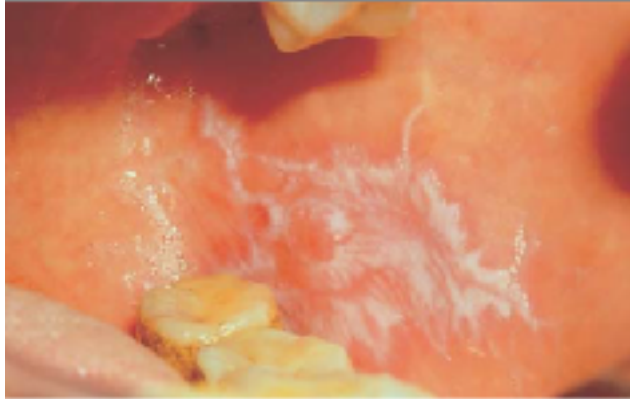


Figura 4: Liquen plano reticular; estrías de Wickham (Imagen tomada de Bascones, 2004).

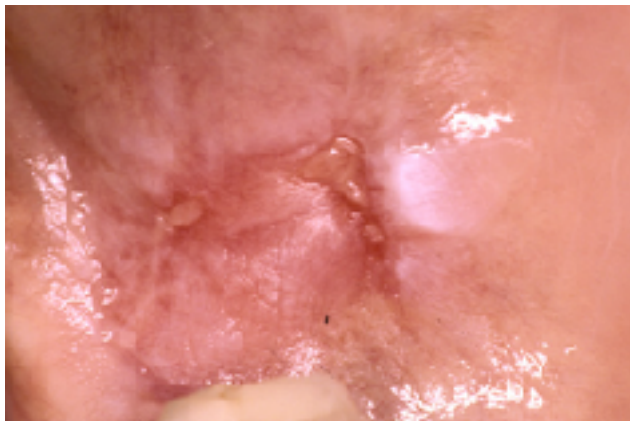


Figura 5: Liquen plano erosivo (Imagen cedida por la Dra. Bascones-Ilundain)

### 1.3.2. Epidemiología:

El liquen plano afecta al 1-2% de la población mundial. La prevalencia del LPO varía entre 0.5-3%. Normalmente afecta a mujeres y la edad de inicio de la enfermedad suele ser entre 30-60 años (Farhi y Dupin, 2010). El subtipo más común de LPO es el reticular y las localizaciones con mayor prevalencia son la mucosa bucal y la lengua (Ismail et al., 2007).

### 1.3.3. Etiología:

Aunque se ha determinado que el LPO es una enfermedad autoinmune mediada por las linfocitos T, la causa de esta enfermedad es parcialmente conocida. Hoy día se acepta que existe una interacción linfocito-epitelio dirigida contra antígenos de los queratinocitos basales del epitelio que culmina con la degeneración del estrato basal del epitelio (Bascones-Ilundain et al., 2006).

Se han propuesto numerosos factores causantes de esta enfermedad: antecedentes genéticos, reacción a materiales (tales como amalgamas, oro, restauraciones de composite...), medicamentos (antimaláricos, sal de oro, antiinflamatorios no esteroideos, hipoglucémicos), agentes infecciosos (virus del herpes simple, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del herpes tipo 6, virus de hepatitis C, virus del papiloma humano), autoinmunidad, insuficiencia inmunológica, alergia alimentaria, estrés, trauma, diabetes e hipertensión, neoplasias malignas, enfermedad de Bowen (Ismail et al., 2007).

### 1.3.4. Diagnóstico clínico:

Aunque el LPO puede afectar cualquier zona de la mucosa oral, las localizaciones más afectadas son mucosa bucal, dorso lingual y encía (Ismail 2007). Dentro de los subtipos del LPO podemos encontrar aquellos de tipo “blanco”: reticular, papular y nodular; de los cuales el reticular es el más común. Estas lesiones suelen ser asintomáticas y presentan un patrón bilateral y



estrías de Wickham mencionadas previamente. En cuanto a las lesiones de tipo “rojo” observamos: atrófico, erosivo y bulloso. El LPO atrófico aparece como una lesión roja y el erosivo como una ulceración irregular cubierta por una placa fibrinosa o pseudomembrana. Ambos, erosivo y atrófico, se asocian a sintomatología dolorosa y sensación de quemazón que incrementa con el traumatismo (durante la masticación), el calor, los ácidos o el picante (Farhi y Dupin, 2007).

#### 1.3.5. Diagnóstico histológico:

En 1906 se describieron por primera vez las características histopatológicas del LPO por Dubrell, aunque ha sido revisada en los últimos años (Farhi y Dupin., 2010). Dentro de las características histopatológicas del LPO (figura 6) se encuentra:

- Degeneración hidrópica de las células basales: degeneración de los queratinocitos basales que está relacionada con la patogénesis de la enfermedad.
- Cuerpos coloides (cuerpos de Civatte): estructuras eosinófilas, redondeadas o lobuladas que a veces contienen núcleos picnóticos o fragmentos nucleares localizados principalmente en la capa basal. Serían los queratinocitos basales que han sufrido necrosis prematura por la degeneración hidrópica de las células basales.
- Infiltrado homogéneo de linfocitos con un patrón en banda a lo largo de la unión epitelio-tejido conjuntivo.
- Maduración de células epiteliales alterada.
- Procesos epiteliales (*Rete pegs*) en forma de dientes de sierra.
- Hiperqueratosis: aumento del espesor de la capa córnea.

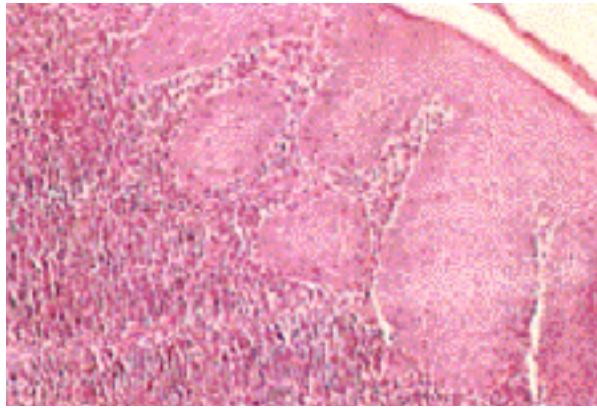


Figura 6: Imagen histológica del LPO (Imagen tomada de Bascones, 2004).

En el tipo erosivo se observa además ulceración a nivel del epitelio (Huber, 2010). No se aprecia diferencia en el mecanismo patogénico entre el LPO reticular y el atrófico-erosivo aunque histológicamente sí que se observa a nivel del corion diferencia en la densidad del infiltrado inflamatorio, siendo mayor en los atrófico-erosivos que en los reticulares (Carozzo et al., 1996).

La variabilidad de diagnósticos diferenciales que se pueden hacer con el LPO (reacción liquenoide, lupus eritematoso, leucoplasia, eritroleucoplasia y leucoplasia proliferativa verrucosa) hace que el diagnóstico clínico por parte de los profesionales no sea preciso. van der Meij y van der Waal, observaron en su estudio que en los casos en los que había consenso en cuanto al diagnóstico clínico, en el 42% de esos casos no había consenso a nivel histopatológico. Y a su vez, en el 50% de casos en los que había consenso a nivel histopatológico, no lo había a nivel clínico (van der Meij y van der Waal, 2003).

#### 1.3.6. Transformación maligna:

El primer caso en el que se relacionó un carcinoma con LPO fue en 1910 y fue diagnosticado por François Henri Hallopeau. En la actualidad los

casos de LPO que sufren malignización se producen entre 0-10% de los pacientes tras un seguimiento de los mismos entre 1.5-10 años (Farhi y Dupin, 2010). En una revisión realizada por Lodi y cols. se obtuvo que la tasa de malignización del LPO se produce entre 0-5.3% (Lodi et al., 2010). También se ha observado que la malignización del LPO puede ocurrir incluso hasta 20 años después de la aparición de la lesión, aunque el mayor riesgo de malignización se ha observado entre los primeros 3-6 años (Bermejo-Fenoll et al., 2009).

La malignización de lesiones de LPO es más común en los tipos erosivo y atrófico, y la probabilidad aumenta cuando la lesión se encuentra en el lateral de la lengua y suelo de la boca. Estos dos subtipos de LPO requieren siempre un diagnóstico histopatológico (Canto et al., 2010, Casparis et al., 2015).

A la hora de hablar de malignización del LPO es importante diferenciar estas lesiones de las reacciones liquenoides que han demostrado tener una mayor tasa de malignización que el LPO : 4.4% vs 1.2% de las lesiones (Casparis 2015). De hecho, hay autores que proponen que en realidad son los pacientes que presentan reacciones liquenoides aquellos que tienen riesgo de malignización, y no los pacientes con LPO (van der Meij et al., 2003).

#### 1.3.7. Tratamiento:

Hoy en día no existe tratamiento para el liquen plano y los tratamientos existentes están destinados al manejo de los síntomas y a detectar/controlar la posible evolución maligna de las lesiones. La mayor parte de los pacientes refieren sintomatología en algún momento que va aumentando y disminuyendo en intensidad.

Los pacientes que presentan LPO reticular, o cualquier otro subtipo asintomático, son controlados sin necesidad de tratamiento, pero los pacientes que presentan síntomas o lesiones con mayor potencial de malignización deben recibir tratamiento. Lo primero que se debe hacer es eliminar los factores traumáticos próximos a la lesión, tales como restos radiculares, aristas cortantes, ganchos de prótesis etc. Es necesario también eliminar los factores irritantes locales como el tabaco, alcohol y especias. La higiene bucal debe ser exquisita eliminando los depósitos de sarro (Bascones-Ilundain et al., 2006). De esta forma, si la lesión revierte al eliminar los posibles factores causales, estaríamos ante una reacción liquenoide.

Para el tratamiento del LPO se recurre al tratamiento tanto tópico como sistémico (Huber, 2010, Scully y Carozzo, 2008, Lodi et al., 2005, Bascones-Ilundain et al., 2006). También deben ser tratadas aquellas lesiones que aún siendo asintomáticas, se hayan biopsiado y presenten displasia.

Los glucocorticoides siguen siendo los fármacos de elección. Actúan como antiinflamatorios inespecíficos e inmunosupresores que reestablecen la función de los linfocitos T supresores. Suelen utilizarse de forma tópica cuando la lesión no es muy severa o como coadyuvante al tratamiento sistémico. Los fármacos más utilizados son: el acetónido de triamcinolona al 0,1% en orabase o en infiltración perilesional a dosis de 30 mg/ml, propionato de clobetasol al 0,05%, acetónido de fluocinolona al 0,025% en orabase, valerato de betametasona en aerosol y fluocinocida al 0,05% en orabase; entre 3-5 veces / día después de las comidas durante 4-6 semanas según la evolución de las lesiones (Bascones-Ilundain et al., 2006). El principal efecto secundario es la sobreinfección por hongos, fundamentalmente por *Cándidas* y por ello algunos autores proponen el uso de antimicóticos paralelamente al uso de corticoides (Micó et al., 2000). En casos severos con lesiones de carácter atrófico-erosivo

intenso se utiliza la vía sistémica con la administración de 40-80 mg/día de prednisona diarios, reduciendo la dosis según la mejoría del cuadro clínico.

Los retinoides actúan sobre el crecimiento y diferenciación celular así como sobre la inflamación reduciendo el infiltrado inflamatorio de linfocitos. Se ha observado que son capaces de reducir el grado de displasia epitelial (Casparis et al., 2015).

También se pueden usar para eliminar las lesiones la excisión quirúrgica, el laser de CO2 y la terapia fotodinámica (Panwar et al., 2014).

Lo más importante en el manejo del paciente con LPO es paliar la sintomatología y realizar un buen seguimiento. Debemos tener en cuenta que un carcinoma puede evolucionar en una localización distinta a la de la lesión de LPO y es esencial para el control de estos pacientes una exhaustiva evaluación de la mucosa oral.

## **1.4 Eritroplasia**

### **1.4.1. Definición:**

Eritroplasia se define como “parche rojo que no puede caracterizarse ni clínica ni patológicamente como otra lesión”. La eritroplasia consiste normalmente en una lesión única, rara vez aparece de forma multicéntrica. Estas lesiones pueden encontrarse en cualquier localización de la mucosa oral, pero son más comunes en el suelo de la boca, mucosa bucal y paladar blando (van der Waal, 2010). Tanto el alcohol como el tabaco se han observado como factores predisponentes para el desarrollo de eritroplasia, pero el tabaco de mascar y nuez de areca (*betel quid*, *gukta*) con o sin tabaco contribuyen en mayor grado (Hashibe et al., 2003).

#### 1.4.2. Epidemiología:

La prevalencia mundial de eritroplasia esta entre 0.02-0.83%, suele aparecer en la edad adulta hacia la vejez y los hombres son más afectados que las mujeres. (Reichart y Philipsen, 2005). No hay datos referentes a la recurrencia de la lesión pero dada su alta tendencia a malignizar y a solaparse en el diagnóstico con el carcinoma *in situ*, es importante realizar un seguimiento regular del paciente.

#### 1.4.3. Etiología:

La etiopatogénesis de esta lesión no es del todo conocida. Se ha observado que el tabaco de mascar, tabaco de fumar y alcohol son los factores predisponentes más importantes para el desarrollo de la eritroplasia, llegando a considerarse el tabaco de mascar y el consumo de alcohol como factores etiológicos (Hashibe et al., 2000). Por otro lado, el papel de la infección por *Candida albicans* todavía no es claro (van der Waal, 2009).

#### 1.4.4. Diagnóstico clínico:

Clínicamente la lesión de eritroplasia presenta un área eritematosa, plana o deprimida con superficie lisa o granular en la mucosa oral (figura 7). En ocasiones la coloración de la lesión es irregular en blanco y rojo, esta variante se denomina eritroleucoplasia. La lesión típica de eritroplasia es única y tiene menos de 1.5 cm de diámetro, aunque el tamaño puede oscilar entre 1-4 cm, y tiene los márgenes bien definidos sin afectar de forma difusa amplias áreas (Reichart y Philipsen, 2005).

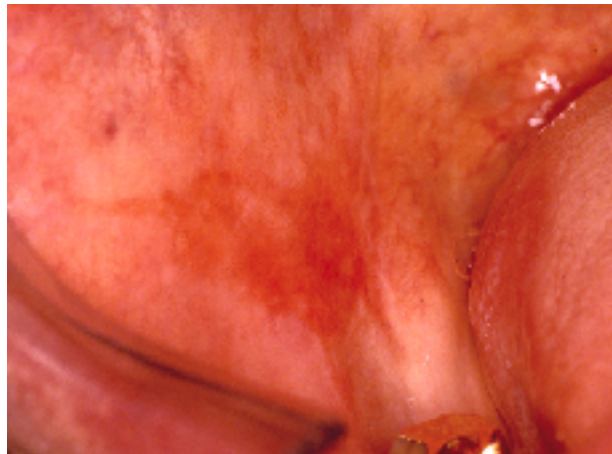


Figura 7: Eritroplasia (Imagen cedida por la Dra. Bascones-Ilundain).

Se debe realizar también un diagnóstico diferencial con otras lesiones de aspecto similar que pueden aparecer en la mucosa oral: candidiasis oral, histoplasmosis oral, tuberculosis oral, LPO atrófico, lupus eritematoso, pénfigo, penfigoide, melanoma amelanótico, hemangioma, telangiectasia, sarcoma de Kaposi, carcinoma oral de células escamosas, irritación local, mucositis, reacción a medicamento, glositis romboidal media y púrpura oral (Reichart y Philipsen, 2005, Villa et al., 2011).

#### 1.4.5. Diagnóstico histológico:

Cuando analizamos una lesión de eritroplasia es común encontrar una ausencia casi completa de paraqueratina y ortoqueratina superficial, que le confiere el color rojo, y un grado de displasia moderado o severo, incluso carcinoma *in situ* o invasivo (Shafer y Waldron, 1975). De ahí la importancia de esta lesión, que pese a ser menos prevalente que otras lesiones potencialmente malignas (leucoplasia, LPO) es una lesión que presenta displasia y puede mostrar un carcinoma.

#### 1.4.6. Transformación maligna:

La tasa de malignización de las lesiones de eritroplasia oscila entre 14-15%, por tanto su tratamiento es de carácter urgente, ya que dicha tasa es superior a la de otras lesiones potencialmente malignas como leucoplasia o LPO (Reichart y Philipsen, 2005, van der Waal, 2010). Por otro lado es difícil calcular la tasa de malignización de estas lesiones porque en muchas ocasiones el análisis histológico revela un carcinoma en el momento de la biopsia. Yen y cols. utilizaron un modelo estadístico de predicción e intentaron estimar la tasa de malignización de lesiones de eritroplasia y concluyeron que la transformación maligna de eritroplasia es del 95% a 20 años (Yen et al., 2008). De hecho algunos autores plantean si la observación clínica de una lesión de eritroplasia significa que estamos ante una lesión potencialmente maligna, o si las lesiones malignas son clínicamente una lesión de eritroplasia (Panwar et al., 2014).

#### 1.4.7. Tratamiento:

Debido a la alta tasa de malignización de este tipo de lesiones es importante que el tratamiento no se demore. El tratamiento de elección en este tipo de lesiones es la excisión completa y amplia de forma quirúrgica, sobre todo en los casos en los que la biopsia muestra un resultado de displasia severa o carcinoma *in situ* (Reichart y Philipsen, 2005). Dado que son lesiones de aproximadamente 1.5 cm y de márgenes definidos, son candidatas perfectas para este tipo de resección. Otras técnicas recomendadas son la resección con láser (van der Waal, 2009). Apenas hay datos en la literatura que aporten información sobre la recurrencia de eritroplasia tras su excisión. En un estudio realizado por Yang y cols., se analizó de forma retrospectiva la recidiva de lesiones diagnosticadas clínicamente como eritroplasia tras su excisión quirúrgica. El diagnóstico histopatológico mostró que de las 84 lesiones, 3 eran carcinomas, 61 eran displasia severa/carcinoma *in situ*, y 20 eran hiperplasia escamosa. Tras un seguimiento medio de 29 meses (1-124) se observó una tasa de recu-



urrencia del 16.7%. El único factor que demostró relación con la recurrencia de la lesión fue la extensión de la misma. Una lesión que excedía los 80mm<sup>2</sup> obtuvo una OR= 5.1 para recurrencia (Yang et al., 2015).

## 2. DISPLASIA EPITELIAL

### 2.1. Definición:

El concepto de displasia epitelial hace referencia al conjunto de alteraciones arquitectónicas (estratificación alterada) y celulares (atipia celular) que sufre el epitelio tendiendo a la malignización. Las células alteradas van reemplazando a los queratinocitos normales desde la capa basal desde donde se invade el resto de los estratos epiteliales (Kuffer y Lombardi, 2002). La displasia epitelial supone un trastorno de la maduración del epitelio (figura 7).

Los criterios usados para diagnosticar el grado de displasia se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2):

<i>Alteraciones en la arquitectura epitelial</i>	<i>Atipia celular</i>
Estratificación epitelial irregular	Alteración en el tamaño nuclear (anisonucleosis).
Pérdida de polaridad de las células	Alteración en la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Hiperplasia de las células basales	Alteración en el tamaño celular (anisocitosis)
Profundización y ensanchamiento de los procesos epiteliales ( <i>rete pegs</i> ) en el corion (forma de gota)	Alteración en la forma celular (pleomorfismo celular)
Aumento en el número de mitosis	Incremento de la relación celular núcleo-citoplasma .
Mitosis superficiales normales y anormales	Aumento del tamaño nuclear
Queratinización prematura en células individuales (disqueratosis)	Figuras mitóticas atípicas
Perlas córneas en las proyecciones epiteliales intraconjuntivas	Aumento de nucleolos (número y tamaño)
	Hipercromasia

Tabla 2: Criterios usados para el diagnóstico de displasia (Banoczy et al., 2001, Warnakularusiya et al., 2008).

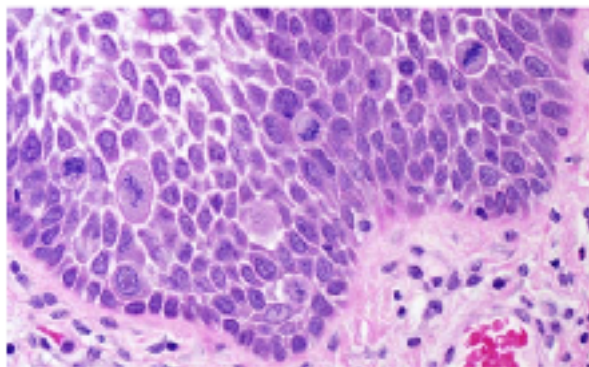


Figura 7: Atipia celular: pleomorfismo celular y figuras mitóticas atípicas (Bouquot et al., 2006).

La displasia epitelial es la alteración definitiva por la cual se considera que el epitelio normal adquiere una situación de enfermedad. Se detecta al microscopio y se considera un factor de riesgo para la transformación maligna (Kujan et al., 2003). En el estudio de Ho y cols. de 2013, el 25% de los pacientes con presencia de displasia epitelial oral monitorizados durante 2 años desarrollaron COCE (Ho et al., 2013). En un estudio anterior de los mismos autores (Ho et al., 2012) se observó una tasa de malignización del 22% en pacientes con presencia de displasia epitelial monitorizados durante 5 años. Se ha determinado que a mayor grado de displasia, mayor riesgo de malignización, aunque también malignizan lesiones sin presencia de displasia (Warnakulasuriya et al., 2008). Parece que si a la presencia de displasia epitelial oral añadimos factores como: apariencia clínica no homogénea de la lesión, ausencia de hábito tabáquico en el paciente y localización de la lesión en el lateral de la lengua, la tasa de malignización aumentaría hasta un 40%. La malignización de lesiones con displasia epitelial se ha observado hasta siete veces más en pacientes no fumadores vs fumadores (OR=7.1) (Ho et al., 2012).

## 2.2. Clasificación:

La Organización Mundial de la Salud (WHO) reconoce 5 estadios histopatológicos en lesiones epiteliales (Barnes et al., 2005):

1. Hiperplasia escamosa: Suele producirse en el estrato espinoso (acantosis) y/o en el estrato basal/parabasal (hiperplasia de las células basales); la arquitectura muestra una estratificación normal sin presencia de atipia celular.

2. Displasia Leve: Alteración en la arquitectura epitelial que queda limitada al tercio inferior del epitelio acompañada de atipia citológica (figura 8).

3. Displasia moderada: Alteración en la arquitectura epitelial que se extiende hasta el tercio medio del epitelio. El grado de atipia celular podría requerir encuadrar la lesión en un grado superior de displasia (figura 9).

4. Displasia severa: La alteración en la arquitectura epitelial y atipia celular afectan a más de dos tercios del epitelio. Aquellos casos en los que el estrato medio presenta un nivel elevado de atipia celular podrían pasar de ser considerados como displasia moderada a displasia severa. De ahí el frecuente solapamiento entre los grados de displasia moderada-severa (figura 10).

5. Carcinoma *in situ*: La alteración en la arquitectura epitelial, casi completa junto con atipia celular muy pronunciada, se encuentra en todo el grosor del epitelio. En este caso la lesión ha sufrido una transformación maligna pero todavía no ha habido invasión del conectivo.

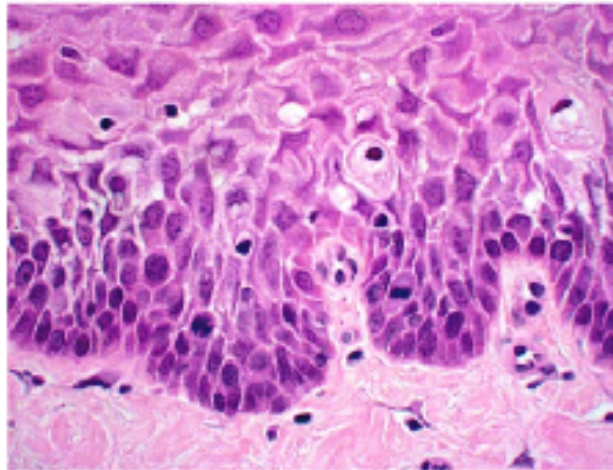


Figura 8: Displasia leve. Presencia de pleomorfismo, hiper Cromatismo e hiperplasia de las células basales. Cambios limitados al tercio basal del epitelio (Imagen tomada de Bouquot et al., 2006).

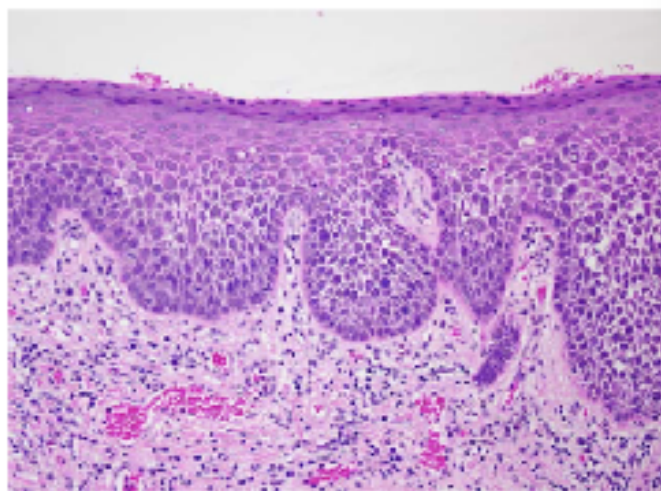


Figura 9: Displasia moderada. Cambios celulares presentes en el estrato basal y en los estratos intermedios del epitelio. Procesos epiteliales (rete pegs) en forma de gota (Imagen tomada de Bouquot et al., 2006).

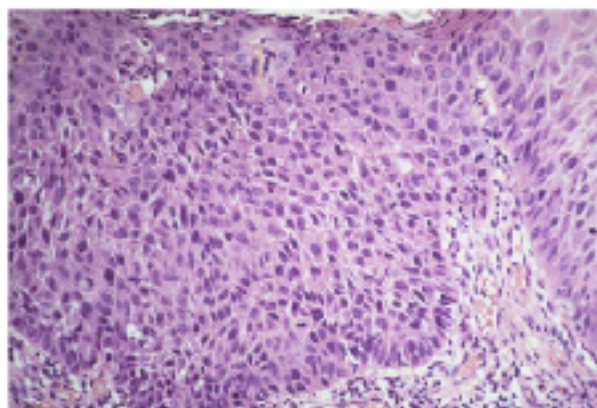


Figura 10: Displasia severa. Atipia celular presente en todo el espesor del epitelio (Imagen tomada de Bouquot et al., 2006).

Debería resaltarse el hecho de que la displasia es un concepto en el que no existen criterios exactos para dividir los casos en leve, moderado y severo. De hecho el diagnóstico está sujeto a la variabilidad intra- en inter-examinador a la hora de realizar el diagnóstico histopatológico para presencia y grado de displasia (Kujan et al., 2007).

Previamente habían surgido otras clasificaciones histopatológicas tales como la clasificación SIN (Squamous Intraepithelial Neoplasia) (Kuffer and Lombardi, 2002) y la clasificación de Ljubljana (Hellquist et al., 1999). La clasificación SIN es similar a la clasificación de WHO pero engloba en una misma categoría el grado de displasia severa y el carcinoma *in situ*. La clasificación de Ljubljana, por otro lado, describe distintos grados de hiperplasia: basal/parabasal y atípica; e igualan una lesión con hiperplasia basal/parabasal al grado de displasia leve de la clasificación WHO. En este caso se igualan una primera lesión benigna con una lesión de displasia que, aunque leve, es considerada ya como lesión potencialmente maligna. También iguala en una misma clase los grados de displasia moderada y severa: hiperplasia atípica. En la tabla 3 se comparan las 3 clasificaciones.

<i>Clasificación WHO</i>	<i>Clasificación SIN</i>	<i>Clasificación de Ljubljana</i>
Hiperplasia escamosa		Hiperplasia escamosa
Displasia leve	SIN 1	Hiperplasia basal/parabasal
Displasia moderada	SIN 2	Hiperplasia atípica
Displasia severa	SIN 3	Hiperplasia atípica
Carcinoma <i>in situ</i>	SIN 3	Carcinoma <i>in situ</i>

Tabla 3: Esquema comparativo de las clasificaciones de grado de displasia (van der Waal, 2009).

### 2.3. Diagnóstico diferencial:

La presencia de una reacción reparativa o regenerativa del epitelio puede darse también en respuesta a trauma, inflamación, irradiación o ulceración, mostrando atipia celular o alteraciones arquitectónicas. Deficiencias nutricionales de hierro, folatos y vitamina B12 pueden también simular displasia epitelial, aunque los cambios en el epitelio son menos marcados (van der Waal, 2009).

Conviene siempre tener en cuenta la historia clínica del paciente de cara al diagnóstico diferencial.

### 2.4. Limitaciones:

Muchos sistemas han sido propuestos para estandarizar la severidad del grado de displasia. Cualquier sistema sería útil si pudiera ser reproducible entre los distintos examinadores. El reconocimiento y la interpretación de las distintas características que definen la displasia epitelial y su grado de severidad varía no solo entre distintos examinadores, sino también en un mismo examinador de un día a otro (Katz et al., 1985).

Se ha observado una gran variabilidad a la hora de determinar el grado de displasia y la estandarización es uno de los mayores problemas a la hora de establecer el diagnóstico y el protocolo a seguir (Katz et al., 1985). La precisión de una herramienta de diagnóstico suele evaluarse de acuerdo a su validez y reproducibilidad, pero a la hora de determinar la precisión del diagnóstico del grado de displasia no hay ningún método considerado como *gold standard* que respalde su validez (Brothwell et al., 2003). De forma que a no ser que se describan criterios claros, determinar el grado de displasia será poco reproducible, no por el desconocimiento de los patólogos, sino por la naturaleza de la displasia (Bosman, 2001).

En el estudio de Machada y Shetty, se analizó el grado de acuerdo intra- e inter-examinador con tres examinadores en el diagnóstico de grado de displasia usando tres tipos de clasificación distintos para el grado de displasia (Machada y Shetty, 2011). Los resultados mostraron que el diagnóstico de displasia epitelial y su grado de severidad no es una ciencia exacta. El acuerdo inter-observador variaba entre 47%-62%, y el acuerdo intra-observador variaba entre 60%-93%. En la revisión de Fleskens y Slootweg, se observaron niveles de acuerdo inter-examinador muy variados, 17-78% (ligero-bueno) para establecer el grado de displasia, y el acuerdo era menor cuando menor era el grado de displasia (Fleskens y Slootweg, 2009).

La variabilidad en el diagnóstico también puede asociarse a las características histopatológicas que se consideren más importantes para el diagnóstico, el entendimiento de las mismas para su reconocimiento, la variabilidad en su observación y las categorías que se utilicen. En el estudio de Machada y Shetty, se observó que la morfología de los procesos epiteliales (*rete pegs*), pérdida de polaridad celular y la hiperplasia de células basales fueron características significativas a la hora de diferenciar el grado de displasia leve-mode-



rado pero no moderado-severo, y al contrario sucedía con las figuras mitóticas atípicas (Machada y Shetty, 2011). Cuando se reduce el número de categorías de una clasificación es más fácil para los examinadores categorizar, pero se pierde información. En el estudio de Speight y cols, se obtuvo un incremento de hasta el 30% en el grado de acuerdo al determinar el grado de displasia con un grupo de expertos (Speight et al., 2015). Aunque, un aumento en el grado de acuerdo no significa necesariamente una mayor precisión diagnóstica.

Idealmente la clasificación del grado de displasia de referencia debería cumplir dos requisitos fundamentales: aplicación fácil en la práctica diaria con baja variabilidad inter- e intra-examinador, y categorización de los pacientes de forma clara en cuanto a la necesidad de tratamiento. Tras el estudio de la reproducibilidad y el grado de acuerdo de las tres clasificaciones antes mencionadas, se ha observado que la clasificación WHO tiene un grado de acuerdo intra- e inter-examinador de 15-59% para lesiones de displasia oral, pero de la clasificación SIN y la clasificación de Ljubljana no se dispone de datos en la literatura sobre el grado de acuerdo en lesiones de displasia de epitelio oral (Fleskens y Slootweg, 2009).

### **3. BIOPSIA DE LA MUCOSA ORAL**

#### **3.1. Definición y consideraciones:**

La biopsia oral es un procedimiento quirúrgico con el que se obtiene tejido de un organismo vivo para su estudio al microscopio y obtener un diagnóstico. Las biopsias de la mucosa oral nos conducen a confirmar un diagnóstico parcial obtenido tras el estudio clínico, también nos pueden ayudar a establecer el pronóstico de lesiones malignas y potencialmente malignas, así como facilitar la prescripción de tratamientos específicos, evaluar la eficacia de tratamientos y constituir un documento legal (Seoane et al., 2008).

La toma de biopsias está indicada para la confirmación de lesiones sospechosas sin causa evidente y aquellas potencialmente malignas; lesiones aparentemente inflamatorias que no mejoran o revierten tras un periodo de observación y después de eliminar posibles factores irritantes. También debería tomarse una biopsia de las lesiones que interfieren con la función oral, de etiología poco clara, particularmente cuando se asocian a dolor, parestesia o anestesia y lesiones intersticiales en la musculatura lingual, bucal y labial (Mota-Ramirez et al., 2007). El examen clínico oral es la principal herramienta de la que disponemos para detectar cambios en la mucosa oral, inspección oral y palpación, aunque a la hora de detectar la presencia de displasia, el examen clínico no es el adecuado. Existen lesiones displásicas en la mucosa oral que presentan un aspecto clínico normal así como lesiones detectadas clínicamente que carecen de displasia. El resultado del examen clínico no es predictivo del resultado histológico, por tanto un análisis histológico es fundamental a la hora de detectar displasia epitelial (Epstein et al., 2012).

Las biopsias orales pueden clasificarse según (Seoane et al., 2008):

Características de la lesión:

*Biopsia directa:* Cuando la lesión se encuentra en la mucosa oral y es fácilmente accesible. Por ejemplo: lesiones potencialmente malignas y lesiones primarias neoplásicas.

*Biopsia indirecta:* Cuando la lesión se encuentra recubierta de una mucosa aparentemente normal.

El área a biopsiar:

*Biopsia incisional:* Toma de una muestra representativa de la lesión y tejido adyacente normal con el objetivo de establecer un diagnóstico definitivo de forma previa al tratamiento.

*Biopsia escisional:* Resección completa de la lesión con un doble objetivo diagnóstico y terapéutico. Tan solo es posible cuando el tamaño de la lesión permite la escisión completa con márgenes adecuados sanos.

El momento de la biopsia:

*Preoperatoria*

*Intraoperatoria*

*Postoperatoria:* con finalidad de evaluar la eficacia de un tratamiento.

### **3.2. Técnica:**

La biopsia convencional con bisturí sigue siendo la técnica de referencia a la hora de investigar lesiones en la cavidad oral. El bisturí frío y el bisturí circular han mostrado la misma proporción de artefactos en las muestras (hendiduras, hemorragias, aplastamientos y pseudoquistes) (Seoane et al., 2008). De forma previa al procedimiento quirúrgico debe efectuarse una historia clínica que recoja aspectos sobre la lesión referentes al tamaño, forma, color, textura, consistencia, tiempo de evolución, síntomas asociados y presencia de adenopatías, con la finalidad de establecer un diagnóstico clínico y un diagnós-

tico diferencial. Además, el paciente debería recibir información al respecto para obtener el consentimiento informado adecuado a esta técnica.

Dentro de los errores más comunes a la hora de tomar una biopsia se encuentran:

- Presionar la muestra con las pinzas, especialmente si son dentadas.
- Infiltrar la solución anestésica dentro de la lesión. Se recomienda bloqueo troncular.
- Aplicar productos en la superficie de la lesión que pueda generar modificaciones titulares.
- Usar un volumen insuficiente de fijador.
- Incluir en la muestra material proveniente de restauraciones dentales, cálculo o polvo de los guantes quirúrgicos.
- Tomar material no representativo o una cantidad insuficiente en extensión y en profundidad.

En cuanto a este último error, Jeong y cols. demostraron en su estudio que las biopsias incisionales normalmente infra-diagnostican lesiones invasivas debido a una inapropiada selección de la localización donde se toma la muestra, inadecuada profundidad de la biopsia tomada o poca cantidad de tejido obtenida (Jeong et al., 2012). Esto resalta la importancia de realizar la biopsia de forma adecuada por parte del clínico. De acuerdo con este estudio, las biopsias escisionales de lesiones sospechosas de tener displasia deberían realizarse siempre en la medida de lo posible, pero esto no es aplicable a aquellas lesiones que son difíciles de aislar debido a su localización o tamaño (Mota-Ramirez et al., 2007). Por tanto, en lesiones potencialmente malignas de pequeño tamaño (<1 cm), estarían indicadas biopsias escisionales. Lesiones mayores requerirían biopsias incisionales que incluyan tejido representativo de la lesión, tejido transicional y márgenes sanos. En las lesiones malignas o con alta sospecha clínica de malignidad se recomienda efectuar biopsias incisiona-

les, reforzado por el hecho de que biopsias escisionales sobre carcinomas orales efectuadas por dentistas generalistas sin criterio oncológico, van a dejar restos microscópicos tumorales y destrucción de los márgenes del carcinoma (Seoane et al., 2008).

La muestra obtenida con tejido patológico y sano debe de presentar suficiente tamaño, de manera que se eviten problemas. Hay que considerar que procesos como la fijación del espécimen puede reducir sensiblemente su tamaño. Además, las muestras pequeñas son difíciles de orientar y de manipular.

El material fundamental para abordar la biopsia con bisturí consiste en: anestesia local, bisturíes (número: 15, 11), pinzas de mosquito, pinzas, sutura, gasas estériles y frasco con solución fijadora. El área a biopsiar se selecciona según el tamaño y localización de la lesión. Normalmente para preparar el campo quirúrgico se utiliza enjuagues con clorhexidina al 0,12-0,20%. No deben usarse antisépticos que contenga yodo y se debe tener cuidado al administrar anestesia local/troncular, evitando infiltrativa ya que produce artefactos en los especímenes. A la hora de tomar la muestra, son preferibles incisiones paralelas a los nervios y los vasos, generalmente se utilizan incisiones elípticas que facilitan la sutura. Si existen diversas lesiones deben efectuarse varias biopsias. Las muestras se deben tratar cuidadosamente evitando producir artefactos (hendiduras, pseudoquistes, aplastamientos, hemorragias y fragmentación). Como agente fijador se utiliza formalina al 10%, dado que induce pocas alteraciones titulares y ocasionalmente podría ser usado el etanol al 70%. Sin embargo, debe evitarse el alcohol metílico o isopropílico, el suero salino y el agua destilada, en virtud de las alteraciones inducidas por estos agentes. El volumen de las soluciones fijadoras debe exceder 10 a 20 veces el volumen de la muestra, que debe ser remitida al patólogo con el pertinente informe explicando diagnóstico de presunción, e información sobre el área biopsiada y la histo-

ria clínica del paciente. Finalmente se sutura la herida y se practican las medidas de hemostasia oportunas (Seoane et al., 2008).

En ocasiones, la indicación para realizar una biopsia es dudosa ya que el aspecto clínico de la lesión no es clínicamente sospechoso, y la decisión para tomar la biopsia depende únicamente en el criterio del profesional. La realización de una biopsia también implica que el paciente contrae una herida que, dependiendo de la profundidad y extensión de la lesión a biopsiar, puede ser incapacitante a la hora de hablar o alimentarse. Estas circunstancias se agravan en los casos en los que la lesión tiene múltiples localizaciones y por tanto requiere varias biopsias, o en aquellas lesiones recurrentes que requieren una biopsia en una misma localización. Por otro lado, existen posibles complicaciones post-quirúrgicas: sangrado durante las siguientes 24 horas, dehiscencias debidas a la sutura (exceso de material , exceso de tensión), infección, alteraciones sensoriales... (Mota-Ramirez et al., 2007).

### **3.3. Tinción:**

Según el tipo de procedimiento a seguir las muestras pueden ser congeladas, embebidas en parafina o metacrilato, para su posterior análisis en microscopio o aplicación de técnicas moleculares. La técnica más usada para el análisis de muestras de mucosa oral es su inmersión en parafina y evaluación con el microscopio óptico. La muestra es fijada en una solución de formol al 10%. Las zonas más características de la lesión son seleccionadas de las muestras de mayor tamaño para su análisis. Los especímenes son procesados en una serie de inmersiones en parafina líquida que implica su deshidratación, para su posterior enfriado y solidificación. La técnica de parafinado tarda alrededor de 24 horas. Posteriormente los bloques de parafina son montados en un porta-

bloques y se procede a su sección con un microtomo. Para su estudio al microscopio se requerirá un proceso de desparafinado, rehidratación y tinción. La técnica de tinción seleccionada depende del tipo de análisis histológico que vaya a realizarse. El más común para el estudio de la displasia epitelial es la tinción con hematoxilina-eosina para su posterior estudio con el microscopio electrónico (García-Peñin, 1990). La tinción con hematoxilina-eosina es un tipo de coloración compuesta o combinada que consiste en la aplicación, a una muestra de tejido u órgano, de varios colorantes con la finalidad de destacar, mediante colores diferentes, estructuras específicas que forman parte de ella, de esta forma, los núcleos se tiñen con la hematoxilina y después la eosina se encarga de colorear al citoplasma.

### **3.4. Uso diagnóstico:**

Las biopsias pueden realizarse con finalidad diagnóstica o experimental aportando información histopatológica sobre nuevas entidades.

La evaluación histopatológica convencional con microscopio óptico de las muestras teñidas con hematoxilina y eosina es todavía el método más válido para diagnosticar el potencial maligno de las lesiones potencialmente malignas, provocando que el sistema de clasificación de la displasia epitelial sea el *gold standard* y actúe como un sistema predictivo (Warnakulasuriya et al., 2008).

#### **4. BIOPSIA TRANSEPITELIAL POR CEPILLADO: ORAL CDX**

Oral CDx® (OralScan Laboratories Inc., Suffern, Nueva York) es una prueba de laboratorio indicada para la evaluación de lesiones tisulares susceptibles de ser lesiones potencialmente malignas o cáncer oral. Se trata de un método diagnóstico que se realiza en la consulta con el que se toma una biopsia transepitelial por cepillado.

El desarrollo de este tipo de biopsias por cepillado fue desarrollada en la década de los 80 aplicada en ginecología para tomar muestras de lesiones en cervix. Esta técnica mejoró la toma de tejido para analizar en calidad y validez comparado con la espátula de madera que se usaba hasta entonces, ya que además era posible acceder a lesiones más profundas (Murata et al., 1990). En el caso de la cavidad oral, nos encontramos ante una mucosa en la que las lesiones no siempre son claras para biopsiar, y además, si lo son, pueden ser de difícil acceso debido a la anatomía adyacente o a la extensión de la lesión, por tanto es razonable que se desarrollen nuevos sistemas orientados a facilitar el diagnóstico.

Sciubba (Sciubba, 1999) determinó que a partir del examen oral se obtenían 2 grupos de lesiones:

Clase I: Lesión sospechosa que requiere la implicación del especialista en medicina oral.

Clase II: Lesión clínicamente inocua que en principio sólo requiere seguimiento.

Según este autor, este tipo de métodos de biopsia por cepillado ayudarían a realizar un diagnóstico precoz de aquellas lesiones de las que no se realizaría una biopsia al ser clínicamente no relevantes. Supondría un primer nivel



diagnóstico no invasivo que el odontólogo general podría utilizar para detectar lesiones que puedan suponer un riesgo para el paciente.

Las indicaciones para utilizar este sistema son (Sciubba, 1999):

- Lesiones “blancas, rojas o blanca-roja”
- Úlceras crónicas
- Lesiones con cambios poco comunes en la superficie: aspecto granular
- Evaluación de trastornos mucocutáneos (por ejemplo, liquen plano) que no responden a tratamiento
- Seguimiento de una lesión persistente a pesar de un diagnóstico benigno establecido por una biopsia previa (por cepillado o convencional)
- Pacientes con antecedentes de cáncer oral o de cabeza y cuello, que presenten alteraciones en la mucosa

Cada kit de Oral CDx® (figura 11) consta de un cepillo precintado y estéril que ha sido diseñado para obtener biopsias transepiteliales con mínimas molestias para los pacientes (figura 12); inicialmente se recomienda su uso sin anestesiarse al paciente. Del correcto uso de este cepillo se obtiene una muestra para biopsia suficiente para su análisis con células del estrato superficial, intermedio y basal. El número de rotaciones a realizar con el cepillo contra la lesión varía según la misma: si ésta es gruesa, se necesitarán unas 15-10 rotaciones del cepillo contra la lesión; cuando la lesión es ulcerada, con unas pocas rotaciones en el margen de la úlcera es suficiente. Tras obtener la muestra de tejido, y en los siguientes 30 segundos, éste se coloca en un porta de vidrio, adjunto en el kit, mediante un movimiento rotatorio a lo largo del porta para transferir la mayor cantidad posible de muestra. Seguidamente, se aplica el fijador sobre el porta asegurando que lo impregna en su totalidad. En el kit se incluyen dos sobres de fijador. Tras dejar secar unos 15 minutos, el porta es incluido en el soporte para el mismo y se cierra para su envío al laboratorio

(Felefli y Flaitz, 2000). Adjunto a la muestra, se envía un formulario que también se incluye en el kit, con información sobre el paciente, localización de la lesión, color y apariencia, diagnóstico de presunción, factores de riesgo (tabaco, alcohol), y duración de la lesión.



Figura 11: Kit OralCDx®: Cepillo, porta de vidrio, dos sobres de fijador y soporte para el porta.



Figura 12: Detalle del cepillo incluido en el kit OralCDx®.

La técnica de biopsia por cepillado Oral CDx® está asistida por un programa de ordenador que analiza las muestras tisulares obtenidas con el cepillo transepitelial. El programa analiza las imágenes del microscopio almacenadas de forma digital obtenidas de las células de la muestra usando un procesador de imágenes diseñado especialmente para detectar alteraciones celulares observadas en lesiones potencialmente malignas y en cáncer oral. Los resultados del análisis son mostrados a un patólogo que tras leer el informe, propone el tratamiento a seguir: seguimiento clínico, repetición de la biopsia o biopsia convencional con bisturí.

Los resultados obtenidos del sistema Oral CDx® se dividen en cuatro categorías (Sciubba, 2001):

- Negativo: No se detecta ninguna evidencia de lesión oral potencialmente maligna o cáncer en el espécimen.
- Positivo: La muestra contiene células displásicas que indican una lesión oral potencialmente maligna o cáncer.
- Atípico: Contiene la evidencia definitiva de atipia celular. Ésta puede ser el resultado de una lesión oral potencialmente maligna o cáncer, pero pueden también deberse a otras causas como la presencia de inflamación.
- Incompleto: La muestra no permite una interpretación completa. La representación celular incompleta puede ser el resultado de muchos factores que deben analizarse antes de repetir el examen.

Todos los pacientes con un informe “positivo” y “atípico” deben ser sometidos a una biopsia tisular. Si las lesiones orales son persistentes, incluso con resultados “negativos”, se recomienda su re-evaluación y un seguimiento adecuado.

El primer estudio realizado evaluando la validez y seguridad de esta prueba diagnóstica, fue realizado por Sciubba en 1999 (Sciubba, 1999). En este ensayo clínico multicéntrico, prospectivo se demostró que el sistema de test de cepillado OralCDx® caracterizado por el uso de un cepillo especialmente diseñado para penetrar en la mucosa y recoger una muestra transepitelial, combinado con un sistema informático que ayuda a analizarla, aportaba resultados muy fiables principalmente debido a la ausencia de resultados falsos negativos. Incluso se afirmó que el OralCDx® es una técnica de alta precisión diagnóstica para las lesiones orales malignas y potencialmente malignas, ya que las lesiones analizadas que dieron un resultado “positivo” o “atípico” demostraron posteriormente presencia de displasia tras su análisis a partir de una biopsia incisional. En este estudio Sciubba analizó lesiones tanto clase I como clase II. Tras la publicación de este estudio, varios autores procedieron a realizar estudios clínicos en distintas poblaciones con distinta prevalencia de COCE y lesiones potencialmente malignas, pero los resultados obtenidos distaban mucho de los obtenidos por Sciubba. Al revisar estos estudios, se observan diferencias metodológicas que hacen difícil compararlos entre ellos: el tamaño muestral, la población, el tipo de lesiones analizadas y el momento de la toma de la biopsia, y por tanto se obtienen resultados muy dispares.

Svirsky y colaboradores en 2002, realizaron un estudio retrospectivo a partir de la base de datos de laboratorios de patología oral que contaban con informes de muestras analizadas con biopsia por cepillado y biopsia con bisturí. En este estudio se analizaron 298 muestras con biopsia con bisturí, de ellas 243 mostraron resultados “positivo” o “atípico” con el cepillado, y sólo 93 confirmaron tener presencia de displasia o COCE y por tanto 150 falsos positivos. El VPP (valor predictivo positivo) calculado en este estudio fue del 38%, es decir, la probabilidad de que un sujeto con resultado “positivo/atípico” estuviera verdaderamente enfermo era del 38% (Svirsky et al., 2002).

En ese mismo año, se publicó otro estudio transversal para determinar la utilidad de este test en la consulta dental. La muestra consistió en odontólogos e higienistas orales que acudieron a la reunión de la ADA (American Dental Association) durante un período de 4 días. En 89 de ellos se observaron lesiones de apariencia benigna, 93, a los que se les realizó una biopsia por cepillado. Se obtuvieron 6 resultados “atípico” y un resultado “positivo”, y de ellos tan solo se realizó biopsia con bisturí del resultado “positivo” y de 3 “atípico”. El resultado “positivo” y 2 resultados “atípico” mostraron presencia de displasia en el análisis tras la biopsia con bisturí, el otro caso fue benigno. El autor no obstante concluyó que el OralCDx® era una buena herramienta adyuvante de diagnóstico, que puede mejorar el proceso de detección de cáncer oral, caracterizando las lesiones orales identificadas a través del examen clínico intraoral, pero hay que tener en cuenta que en este estudio no se tomó una biopsia por paciente sino por lesión, sólo se realizaron ambos tipos de biopsia en 4 lesiones. Además se desconoce el intervalo de tiempo entre la toma de ambas biopsias, y la muestra seleccionada no es representativa de la población, de hecho el número de participantes que se sometieron a ambas biopsias fue tan bajo que la validez de la prueba y la tasa de resultados falsos negativos no pudo determinarse (Christian, 2002).

Con la intención de eliminar posibles sesgos, fueron diseñados nuevos estudios para evaluar la validez diagnóstica del test OralCDx®. Scheifele y colaboradores en 2004, evaluaron la precisión diagnóstica del OralCDx® en un estudio retrospectivo en el que incluyeron 80 sujetos seleccionados de forma consecutiva, con una lesión oral con diagnóstico clínico de leucoplasia, LPO o COCE, análisis patológico a partir de una muestra obtenida con biopsia con bisturí, y que de cada lesión hubiera disponibilidad de una biopsia por cepillado, obtenida con OralCDx®, tomada un mes antes o después de la biopsia convencional. Se calcularon la sensibilidad (S), especificidad (E), y los cocien-

tes de probabilidad positivo y negativo. La tasa de resultados “inadecuados” obtenidos con el OralCDx® fue 6,8%. Este valor es superior a lo observado por otros autores (media 3,7%, variando entre el 2% al 7%) (Sciubba, 1999). Para un resultado “positivo” con OralCDx®, la S fue 61,5% y la E fue 97,1%. Cuando los resultados “positivo” y “atípico” se combinaban, la S fue del 92,3% y la E del 94,3%. El cociente de probabilidad positivo fue 16,2 (0,923/1-0,943) y el cociente de probabilidad negativo fue 0,08. Se ha considerado que en casos con hiperqueratinización del epitelio oral la toma de biopsia con el sistema OralCDx® debe ser más insistente para atravesar el grosor del epitelio y obtener muestras adecuadas (Scheifele et al., 2004). En este estudio el momento de toma de ambas muestras no fue estandarizado, e incluyeron muestras de lesiones ya diagnosticadas histológicamente como lesiones con potencial maligno y COCE ya establecido.

Poate y colaboradores, realizaron un estudio retrospectivo incluyendo 112 muestras de la Unidad de Medicina Oral del Instituto Eastman, en Londres (Poate et al., 2004). En este estudio en 44 de 112 muestras la biopsia con bisturí se realizó tanto en los resultados “positivo” y “atípico” como “negativo”, y se incluyeron para el análisis de sensibilidad (S), especificidad (E) y valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) para el test OralCDx®. La S para detectar displasia epitelial o COCE del OralCDx® fue 71,4% y la E fue 32%. El VPP de un resultado “positivo” o “atípico” del OralCDx® fue 44,1% y el VPN fue 60%. Seis de los 15 resultados negativos obtenidos con el OralCDx® fueron positivos para displasia o carcinoma en la histopatología. Los autores explican los falsos negativos en relación con la demora en la toma de la biopsia con bisturí, una transformación maligna rápida de lesiones consideradas benignas por el OralCDx® sería posible.

Hohlweg-Majert y colaboradores, evaluaron la ventaja del sistema OralCDx® como herramienta de screening para la detección precoz de lesiones orales potencialmente malignas. Un total de 75 sujetos participaron en este estudio prospectivo, controlado y aleatorizado en el que se incluyeron lesiones clínicamente benignas de color blanco, rojo o mezcla. La S para la detección de un resultado “positivo” o “atípico” con el OralCDx® fue 52%, la E 29%, VPP 63%, VPN 21%. De acuerdo con estos hallazgos, se concluyó que el uso del OralCDx® no presenta ventajas diagnósticas frente a la prueba estándar establecida. Cabe destacar que este estudio obtuvo 6 falsos negativos y 15 falsos positivos (Hohlweg-Majert et al., 2009). Este estudio excluyó las lesiones clínicamente sospechosas o con apariencia maligna, es decir, fue de los primeros en centrarse únicamente en lesiones clínicamente benignas; aunque sólo se analizaban con biopsia con bisturí tras confirmar un diagnóstico “positivo” o “atípico”.

En la India, la presencia del Cáncer oral supone el 40% de todos los cánceres (Mehrotra et al., 2011) y por tanto el diagnóstico precoz de presencia de displasia en lesiones potencialmente malignas cobra mayor importancia. En esta población destacan dos estudios: Mehrotra y colaboradores, y Reddy y colaboradores (Mehrotra et al., 2011, Reddy et al., 2012). Por un lado Mehrotra y colaboradores, realizaron su estudio en pacientes con lesiones orales de aspecto clínico “mínimamente sospechoso”. En este estudio, por primera vez, todas las muestras se tomaron de lesiones clínicamente benignas, y ambos tipos de biopsias en cada lesión en el mismo momento, al contrario de los estudios previamente mencionados. Un equipo de especialistas seleccionó los pacientes de forma consecutiva. El mismo examinador realizó la biopsia por cepillado OralCDx® y luego, la biopsia de la misma lesión, en la misma localización y en la misma visita. Los resultados de ambas pruebas se determinaron

de forma ciega. Los resultados anormales (“positivo” y “atípico”) se compararon con los de la histopatología. Un total de 820 sujetos participaron en el estudio. De ellos, 85 (en su mayoría hombres) tenían una lesión “mínimamente sospechosa” de color blanco o rojo y de etiología desconocida. Algo menos de la mitad de las lesiones se localizaban en la mucosa bucal (una zona considerada de bajo riesgo para cáncer oral). La edad media de los pacientes fue 45,5 años. Más del 50% eran consumidores de tabaco, alcohol, o ambos. De los 85 sujetos, 79 tenían un resultado, de ellos 27 tenían evidencia histopatológica de displasia epitelial o carcinoma identificado también con el OralCDx®. Se obtuvieron resultados muy prometedores: la S calculada fue 96,3%, la E de un resultado positivo fue 100% y de un resultado atípico fue 90,4%. El VPP de un resultado “positivo/atípico” del OralCDx® fue 84% y el VPN fue 98%. Dentro de las limitaciones de este estudio se encuentra la ausencia de calibración entre examinadores para el tipo de lesiones definidas como “mínimamente sospechosas”, un hecho que estuvo, por tanto, sujeto a la interpretación de cada examinador; y también el hecho de que los resultados obtenidos no se pueden extrapolar a otras poblaciones.

Por otro lado, Reddy y colaboradores, realizaron un estudio en pacientes de un hospital de la India con lesiones orales diagnosticadas clínicamente como leucoplasia. Se seleccionaron 60 pacientes basado en la historia clínica y en el examen clínico del paciente. Los sujetos no eran conscientes de sus lesiones, que eran asintomáticas. Tras descartar otras lesiones como infecciones por hongos, todas las lesiones se sometieron primero a una biopsia con el OralCDx® y después a una biopsia con bisturí para análisis histopatológico. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud para un resultado positivo y negativo del OralCDx®. Todos los sujetos eran fumadores. La localización más frecuente fue la mucosa bucal (n=36),



resultados que coinciden con lo observado por otros autores (Sciubba, 1999, Christian, 2002, Svirsky et al., 2002, Poate et al., 2004), seguido de mucosa queratinizada y lengua. La S fue 43,5%, la E 81,25% y el VPP 58,3% (Reddy et al., 2012). Una de las limitaciones de este estudio es que sólo se incluyeron lesiones diagnosticadas como leucoplasia, sin considerar eritroplasia u otras lesiones con alto riesgo de malignización, además el diagnóstico fue realizado por profesionales médicos distintos a odontólogos o especialistas en medicina oral y no se especifica el intervalo de tiempo entre los dos tipos de biopsia.

Seijas-Naya y colaboradores en 2012, evaluaron la eficacia del OralCDx® como método para el diagnóstico precoz y control de lesiones orales potencialmente malignas. Estos investigadores realizaron un estudio en el que se tomaron muestras con OralCDx® en 24 pacientes que acudieron al Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Universidad de Santiago de Compostela. Los pacientes incluidos presentaban lesiones orales clínica e histológicamente compatibles con leucoplasia oral. Además del color y ubicación, se realizó una evaluación (subjética) del grado de queratinización de las lesiones. Se recogió una sola muestra por paciente. La biopsia con bisturí se tomó 3 semanas antes o después de la biopsia con el OralCDx®. Estos investigadores evaluaron: la relación entre el grado de queratinización de las lesiones y la representación celular; el diagnóstico obtenido a través de OralCDx® y la biopsia con bisturí; y la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba diagnóstica. De las 24 muestras, 16 fueron adecuadas. En cuanto a la influencia del grado de queratinización en la representación celular, los resultados mostraron que de las lesiones poco queratinizadas siempre se obtuvieron muestras completas, en el 28.5% de las lesiones moderadamente queratinizadas sólo se obtuvieron células superficiales e intermedias y en el 66.6% de las lesiones altamente queratinizadas sólo se logró obtener una muestra incomple-

ta. El coeficiente kappa para la relación queratinización de las lesiones y representación celular fue de 33% (ligera concordancia). Estos resultados están de acuerdo con lo que era de esperar, ya que no es posible obtener resultados adecuados en lesiones muy queratinizadas, por lo que la técnica, en estos casos, está, en general, contraindicada (Sciubba, 1999, Scheifele et al., 2004, Warnakulasuriya et al., 2008). La S fue 72,3% y la E fue 92,3%. El VPP fue 88,8% y el VPN 80% (Seijas-Naya et al., 2012). Los autores concluyeron que los valores de S y E observados muestran que la prueba diagnóstica OralCDx® es una buena herramienta para el seguimiento o control de lesiones de leucoplasia oral. En este estudio las muestras no fueron tomadas al mismo tiempo sino con un intervalo de 21 días, y para el análisis, los autores incluyeron todos los casos, incluso las muestras con representación celular insuficiente que, por definición, deben excluirse del análisis.

Uno de los últimos estudios publicados en la literatura analizando ambas técnicas de biopsia ha sido el estudio realizado por Casparis y colaboradores en la Universidad de Zurich. En este estudio se tomaron 263 biopsias de 200 pacientes que presentaban “desórdenes potencialmente malignos”. La biopsia con OralCDx® se tomó en todas las lesiones y se observaron 39 resultados “atípico” y 7 resultados “positivo”. De ellos, en los 7 resultados “positivo” y 29 “atípico” se llevó a cabo la biopsia con bisturí, así como en 17 resultados “negativo” y en 3 “inadecuado”. En los otros 10 casos “atípico” no se realizó biopsia con bisturí ya que en el seguimiento de las lesiones no se observó ningún cambio clínico. La S para resultados “positivo/atípico” fue 90%, la E 44.1%, VPP 47.2% y VPN 88.2% (Casparis et al., 2014). Uno de los límites de este estudio es que mantienen un intervalo de tiempo entre biopsias y solo toman la biopsia con bisturí en los casos que tuvieron alteraciones clínicas en el seguimiento.

En resumen, dadas las discrepancias entre los estudios publicados en la literatura, es necesario realizar estudios en los que se analicen lesiones orales potencialmente malignas con ambos tipos de técnicas de biopsia independientemente del resultado de las mismas, y ambas en el mismo momento (Lingen et al., 2008).

## 5. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### **Justificación:**

Es difícil predecir el comportamiento clínico de las lesiones potencialmente malignas basándonos solo en el análisis clínico. Es necesario por tanto obtener la mayor información posible sobre la lesión para poder determinar el riesgo de futura malignización.

En los casos en los que la lesión tiene una apariencia clínicamente benigna, depende del clínico que se biopsie o no. La biopsia convencional es un método invasivo que deja una herida en la mucosa del paciente, que durante la cicatrización puede limitar al paciente a la hora de hablar, alimentarse, y por tanto, el uso de el OralCDx® como técnica de biopsia mínimamente invasiva estaría justificado en lugar de la biopsia con bisturí, y podría ser la herramienta de referencia en aquellas lesiones dudosas o de apariencia benigna persistentes o en pacientes de alto riesgo.

Existe controversia en la literatura respecto a la precisión diagnóstica clínica de las lesiones orales potencialmente malignas. La biopsia por cepillado con el OralCDx® podría ser un método útil en la identificación de lesiones en la cavidad oral con distintos grados de displasia, incluyendo aquellos grados iniciales. Al ser un método mínimamente invasivo también podría usarse para monitorizar lesiones con resultados no concluyentes o lesiones benignas en pacientes de alto riesgo.

### **Hipótesis:**

Se propone la biopsia por cepillado con el OralCdx® como un método preciso para el diagnóstico de lesiones de displasia de la cavidad oral en sujetos con lesiones epiteliales intraorales de aspecto clínico benigno.

Con este trabajo se pretende rechazar la siguiente hipótesis nula: el OralCDx® no es un método preciso para la detección de displasia en lesiones intraorales de aspecto clínicamente benigno.

## 6. OBJETIVOS

### ***Objetivo principal:***

Realizar un estudio de precisión diagnóstica del test OralCDx®, que consiste en una biopsia transepitelial por cepillado, en comparación con la biopsia convencional con bisturí considerada como la prueba o test de referencia, para la detección de displasia epitelial.

### ***Objetivos específicos:***

1. Se pretende determinar la utilidad de la biopsia por cepillado OralCDx® en lesiones epiteliales orales de aspecto clínico benigno.
2. Evaluar el grado de concordancia entre ambas técnicas, índice y referencia, calculando la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, y cocientes de probabilidad (*Likelihood ratio*) positivo y negativo.
3. Evaluar el grado de concordancia inter-examinador en el diagnóstico de displasia epitelial.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **III MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la financiación del proyecto se contó con la ayuda de una Beca de la Fundación Mutua Madrileña (AP 87102011). El protocolo del proyecto se redacta detalladamente a continuación.

#### **1. DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Estudio de precisión diagnóstica que compara la biopsia transepitelial por cepillado Oral CDx® con la biopsia convencional con bisturí, gold standard, a la hora de diagnosticar el grado de displasia epitelial en lesiones orales clínicamente benignas. Este estudio se realizó en una serie de casos seleccionados de forma consecutiva cuyas lesiones fueron analizadas de forma transversal.

#### **2. CONSENTIMIENTO DEL COMITÉ ÉTICO:**

Previo al comienzo del Proyecto de investigación se preparó una memoria que fue entregada en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, donde se aprobó la viabilidad del estudio por parte del Comité ético. El número de registro fue el E09/285. El informe del Comité ético se adjunta en el Anexo.

#### **3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA:**

Para el estudio se seleccionaron pacientes que acudieron al Departamento de Estomatología III, Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, entre febrero de 2010 y octubre de 2012, derivados por su odontólogo, en base a los siguientes criterios:

##### *Criterios de Inclusión:*

- Ambos sexos.
- Edad igual o superior a 18 años.



- ASA Tipo I ó II.
- Presencia de lesión intraoral única ó múltiple de aspecto sospechoso con componente epitelial de aspecto benigno a la inspección clínica visual que bajo la opinión del investigador requiere inicialmente sólo un seguimiento clínico.

*Criterios de Exclusión:*

- Lesiones intraorales submucosas ó cubiertas con un epitelio intacto de aspecto clínico normal, como por ejemplo quistes, tumores de las glándulas salivales, mucocelos, como fibromas, lesiones pigmentadas o hemangiomas.
- Lesiones del labio, específicamente en el bermellón del labio o en las superficies cutáneas.
- Pacientes con contraindicación formal de cirugía oral.
- Pacientes con historia previa de neoplasia.

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio. Se registró información sobre la edad, sexo, hábito tabáquico y consumo de alcohol de los pacientes que participaron en el estudio, así como color y localización de la lesión. Los examinadores fueron cinco odontólogos especialistas en medicina oral que se han sometido a una calibración técnica entre si. Los ensayos de calibración se llevaron a cabo antes de comenzar con el estudio, consistiendo en evaluación de diapositivas y evaluación paralela de los mismos examinadores (Rubio-Colavida et al., 1997). Se utilizaron 10 fotos de lesiones que fueron analizadas por cada uno de los examinadores dos veces en días distintos. Los resultados se comparan entre los dados por el mismo examinador (concordancia intra-examinador) y con el de un examinador de referencia, (V.G.G.) (concordancia inter-examinador). El grado de concordancia intra- e inter-examinador fue superior al 80%.

#### 4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO:

La prueba índice – biopsia por cepillado con OralCDx® - y la prueba de referencia - Biopsia con bisturí - fueron aceptadas por pacientes y profesionales. Tras realizar un examen visual y táctil, los examinadores procedieron a tomar las muestras bajo anestesia local (Articaína 4% con epinefrina 1:100.000, Inibsa lab.). Un mismo examinador realizó primero la biopsia por cepillado y seguidamente la biopsia convencional con bisturí de forma incisional.

*Prueba Índice:* Biopsia por cepillado con el OralCDx®. Tomada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las instrucciones completas para la utilización van incluidas en el *kit*. Cada *kit* OralCDx® está previsto para un solo uso en un solo paciente y contiene un instrumento estéril para recoger la muestra, un porta-objetos de cristal con la identificación de la muestra (donde se transfiere el material recogido), un fijador de alcohol (92.4%) y una ficha de datos del paciente.

*Prueba de Referencia:* Biopsia convencional con bisturí (incisional) de la misma lesión, tomada justo después de la biopsia por cepillado. Se utilizó hoja de bisturí de 15 o 15C (B-Braun, Germany) y sutura no reabsorbible de 4.0 (Supramid. Árago SL, España). El paciente fue citado a los 15 días con el mismo examinador que realizó la biopsia para retirar los puntos. El espécimen se introdujo en un bote con formol al 10% en el que se transportó al laboratorio. El fijador sirve para detener la vida de las células e impedir las modificaciones post-mortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos. Once muestras aleatorias fueron analizadas por un segundo patólogo (M.P.G.) durante el estudio para analizar el grado de concordancia inter-examinador para el diagnóstico de displasia.

## 5. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO:

Los profesionales encargados de realizar el análisis histopatológico al microscopio y los profesionales encargados de analizar las muestras obtenidas a partir de OralCDx® eran independientes y ciegos a las características de la lesión y al resultado de la otra prueba.

*Prueba índice:* Análisis citológico. Las muestras se enviaron por correo postal a los Laboratorios Inibsa, Barcelona, España. Allí tras realizar la tinción de las muestras (tinción Papanicolaou), se empleó un sistema asistido por ordenador asociado al OralCDx® para la detección de atipia celular. La tinción de Papanicolaou es un examen basado en la coloración de *smears* (frotis) en general (vaginal, cervical, prostático, oral) o para fluidos corporales (peritoneal, pleural, gástrico, urinario, espinal, etc), del cual se obtiene una tinción en azules de los núcleos celulares, células acidófilas en rojo-naranja, células basófilas en verde-azulado y estructuras impregnadas en sangre en naranja-verdoso. Uno de sus usos más comunes es el de detección de cáncer de cérvix, al teñir el tejido obtenido tras un frotis de la zona. En este caso, una tinción positiva puede ser índice de: inflamación (por diferentes causas), signos tempranos de cáncer (displasia) o signos de cáncer más avanzado. De forma similar, esta tinción se utiliza en el epitelio oral para la detección de displasia.

El sistema asistido por ordenador permite que una cantidad pequeña de células anormales, ocultas entre las células normales, sean identificadas por un sistema de análisis de imagen (CDx) en distintos estratos epiteliales. Todas las células son analizadas mediante un programa de imagen que permite una visión tridimensional de la muestra (*3D- Micro-biopsy*), basado en un algoritmo desarrollado por el programa de misiles del departamento de defensa de los Estados Unidos. Es capaz de analizar aproximadamente 100.00 células de cada muestra y aquellas que presentan alteraciones son escaneadas de nuevo en ma-

yor detalle. Las células más “sospechosas” de la muestra, aproximadamente unas 200, son resaltadas para que el patólogo comience el análisis. Estas células “sospechosas” son aquellas que presentan algún tipo de atipia celular, y por tanto podrían ser compatibles con la presencia de displasia. Este sistema fue optimizado para detectar lesiones orales potencialmente malignizables y cáncer oral (Casparis et al., 2014). Los resultados de esta prueba se obtenían en un informe escrito y se clasificaban en cuatro tipos: positivo, atípico, negativo e incompleto (Tabla 4) (Sciubba, 2001, Casparis et al., 2014).

POSITIVO	Contiene células displásicas que indican una lesión oral precancerosa o cancerosa y, por lo tanto, todos los pacientes con un informe “positivo” deben ser sometidos a una biopsia tisular.
ATÍPICO	Contiene la evidencia definitiva de células displásicas. Estas células atípicas pueden ser el resultado de una lesión oral precancerosa o cancerosa, pero pueden también estar causadas por condiciones no cancerosas, tales como la presencia de inflamación. Por lo tanto, todos los pacientes con un informe “atípico” deben ser sometidos a biopsia tisular.
NEGATIVO	Ninguna evidencia de un proceso precanceroso o canceroso en el espécimen. Las lesiones orales persistentes, incluso con resultados “negativos”, deben ser revaluadas y tener un seguimiento adecuado.
INCOMPLETO	La observación de la celularidad no permite una interpretación completa. La representación celular incompleta puede ser el resultado de muchos factores que deben analizarse antes de repetir el examen.

Tabla 4: Resultados de la biopsia por cepillado Oral CDx® (prueba índice).

*Prueba de referencia:* Análisis histopatológico. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Patología Oral y Maxilofacial de la Universidad del País Vasco, Leioa, España. Un solo examinador, ciego a los resultados de la prueba índice, realizó el análisis (patólogo, J.M.A.). Las muestras fueron embebidas

en parafina para poder obtener cortes en el microtomo. Para poder realizar la tinción con hematoxilina-eosina se siguió el siguiente proceso: desparafinado con xilol, hidratación con baños decrecientes en concentración alcohólica, coloración con hematoxilina, lavado en agua destilada, eliminación del exceso de coloración, coloración con eosina, deshidratación (con baños crecientes de alcohol) y aclarado con xilol. Con esta tinción los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta; el citoplasma y material extracelular en diversos grados de color rosado. Posteriormente se procedió al montaje con el cual la muestra esta protegida. Para ello se coloca encima del corte coloreado una gota de una sustancia adherente, diluida en xilol y encima de ellos, una laminilla cobre-objetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina. Los especímenes fueron analizados por el patólogo al microscopio óptico. Los resultados incluían el análisis microscópico y el diagnóstico: presencia o ausencia de displasia.

Once muestras seleccionadas de forma aleatoria fueron analizadas también por un segundo patólogo (M.P.G.) para calcular el grado de concordancia inter-examinador para detección de presencia de displasia.

## 6. VARIABLES DEL ESTUDIO:

Variable respuesta primaria: presencia de displasia epitelial, determinada por:

- Análisis citológico (OralCDx®): Resultado “positivo” o “atípico”.
- Análisis histopatológico (Biopsia incisional con bisturí): Presencia de displasia.

### Variables respuesta secundarias:

- *Edad*: Con esta variable se dividió a los pacientes de forma arbitraria en dos grupos: mayores o igual a 50 años y menores de 50 años.

- *Sexo*: Contempla dos posibilidades: Hombre ó Mujer.

- *Tabaco*: Esta variable contempla si el paciente es Fumador habitual (F), No Fumador (NF) ó Ex-fumador (EXF). Siguiendo el criterio de la OMS, se define como *Fumador* a toda persona que ha fumado diariamente durante el último mes cualquier cantidad de cigarrillos, incluso uno; como *Ex-fumador* a aquellas personas que, habiendo sido fumadores, no han consumido tabaco en los últimos 6 meses aunque el criterio más utilizado actualmente y en el que nos basaremos, es el que considera ex fumador a la persona que, habiendo sido fumador, lleva 1 año sin fumar, ya que en estos casos se estima que menos de un 10% volverá a hacerlo y como *No fumador* a los sujetos que nunca han tenido una exposición al tabaco de forma activa ni mantenida. También se recogieron datos sobre el número de cigarrillos que fumaban al día los pacientes fumadores: menos de 10, 10-20, más de 20.

- *Alcohol*: Esta variable se refiere a si el paciente es un consumidor habitual, diario, de alcohol (Si) ó no (No).

- *Color de la lesión*: Relacionada con su apariencia y diagnóstico clínico: Blanco, rojo, blanco-rojo.

- *Localización de la lesión*: Se contemplan varias localizaciones: Borde lateral de la lengua, suelo de la boca, zona ventral de la lengua, paladar blando, área de unión paladar duro-blando, encía y área retromolar.

- *Riesgo de Malignización*: En la literatura se ha observado que determinado aspecto clínico (verrucoso) y localización (borde lateral de la lengua-suelo de la boca) suponen un mayor riesgo de malignización.

- *Tamaño de la lesión*: Las lesiones se clasificaron según su tamaño en menores de 5mm, entre 5 y 10mm o mayores de 10mm.

- *Duración de la lesión*: Hace referencia al tiempo que la lesión ha permanecido en la cavidad oral. Nos basamos en la información de la historia clínica y en la información dada por el paciente. Se clasificaron las lesiones según hubieran permanecido menos de 6 meses, entre 6 y 12 meses o más de 12 meses.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

El análisis estadístico, estadística descriptiva y tablas de contingencia, se realizó con el programa SPSS 22.0 para Windows.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (SPSS, 2013):

- Estadística descriptiva de las variables cualitativas (procedimiento FREQUENCIES), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías. (*Ferrán, 1996*).
- Estadístico de Kappa (procedimiento CROSSTABS) para medir el acuerdo entre las evaluaciones de dos examinadores o inter-examinador en la variable cualitativa del estudio. (*Everitt, 1992, Ferrán, 1996*). Un valor igual a 1 indica un acuerdo perfecto. Un valor igual a 0 indica que el acuerdo no es mejor que el que se obtendría por azar (*Landis y Koch, 1977*).
- Tablas de contingencia para el cálculo de los índices de Sensibilidad, Especificidad y Factores de riesgo (procedimiento CROSSTABS) (*Everitt, 1992, Ferrán, 1996*).

Se confirmaron histológicamente los resultados de la biopsia por cepillado llevando a cabo una biopsia para exploración histopatológica, como *gold standard*, en todos los casos incluidos en el estudio. De la comparación de ambas técnicas, se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y cociente de probabilidad positivo y negativo (CPP y CPN). Estos dos últimos parámetros requieren unos valores de  $>10.0$  para el CPP y  $<0.1$  para el CPN a la hora de recomendar un test para su uso en clínica (*Jaeschke et al., 1994*). Se calculó el Intervalo de Confianza al 95% para los distintos parámetros.



## RESULTADOS

## **IV RESULTADOS**

### **1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA**

Se reclutaron en total 36 pacientes de forma no consecutiva en el departamento de Estomatología III, Medicina y Cirugía Bucofacial, de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid entre febrero de 2010 y octubre de 2012. Las características demográficas de los pacientes están resumidas en la tabla 5.

En la muestra de este estudio la presencia de mujeres era mayor que la de los hombres, 22 y 14 pacientes respectivamente. En cuanto a la edad, los sujetos de la muestra estaban divididos prácticamente por igual en el grupo de menores de 50 años, 17 pacientes, y el grupo de 50 años y mayores, 19 pacientes; aunque se observó que las mujeres tenían más edad que los hombres:  $52.2 \pm 14.2$  y  $50.94 \pm 11.05$  respectivamente.

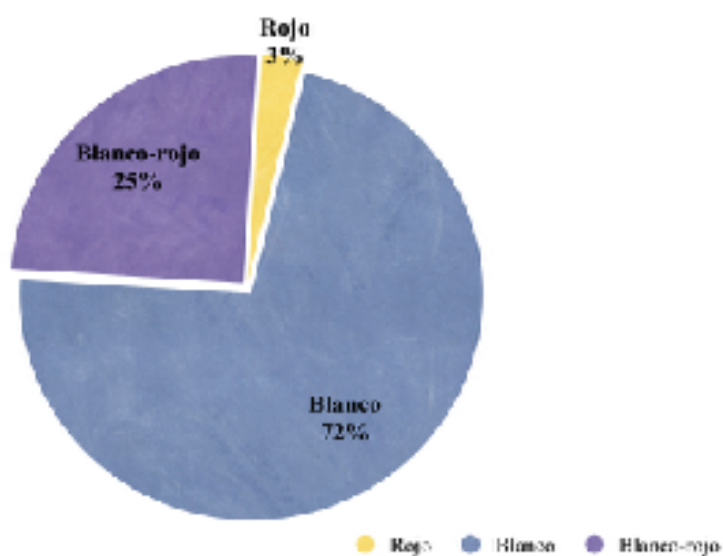
En cuanto a los hábitos de los pacientes, del total de la muestra, se dio el mismo número de fumadores y no fumadores. Ningún paciente fue incluido en la categoría de ex-fumador. De los pacientes que fumaban, 11 fumaban más de 20 cigarrillos al día, 4 pacientes fumaban entre 10-20 cigarrillos al día y 3 pacientes fumaban menos de 10 cigarrillos al día, suponiendo el 30.6%, 11.1% y 8.3% de la muestra respectivamente. Del total de la muestra 11 pacientes (30.6%) admitieron consumo de alcohol esporádico y 3 de ellos de forma diaria.

Sexo	Mujeres (n=14)	Hombres (n=22)
Edad	52.2 ± 14.2	50.94 ± 11.05
Consumo de tabaco	18:18 (si:no)	
> 20 cig/día	11	
10-20 cig/día	4	
<10 cig/día	3	
Consumo de alcohol	11:25 (si:no)	

Cig/día: cigarrillos al día; Edad (años).

Tabla 5: Características de la muestra (n=36).

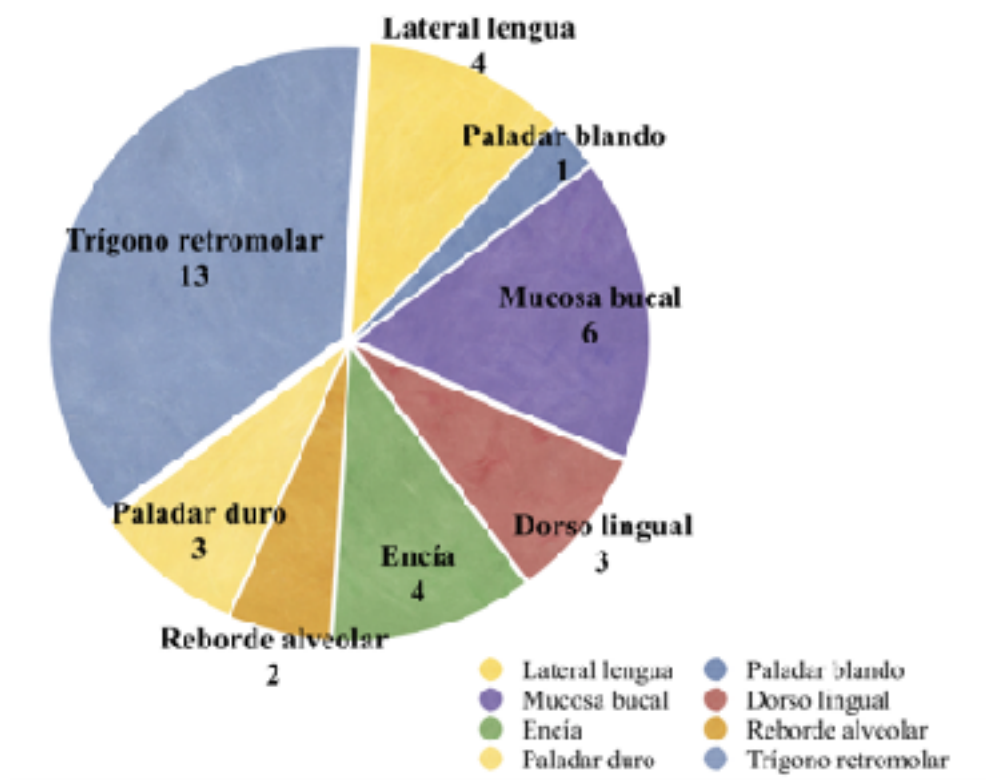
Las lesiones analizadas en este estudio fueron clasificadas en 3 sub-tipos según el color de la lesión y apariencia clínica. De las 36 muestras biopsiadas, una por paciente, 26 eran lesiones blancas, 1 lesión roja y 9 lesiones con mezcla de color blanco-rojo, suponiendo el 72.2%, 2.8% y 25% de las lesiones respectivamente (gráfica 1). El diagnóstico clínico de presunción de las lesiones fue: leucoplasia oral (21 lesiones) y LPO (15 lesiones).



Gráfica 1: Distribución de las lesiones según su apariencia clínica.

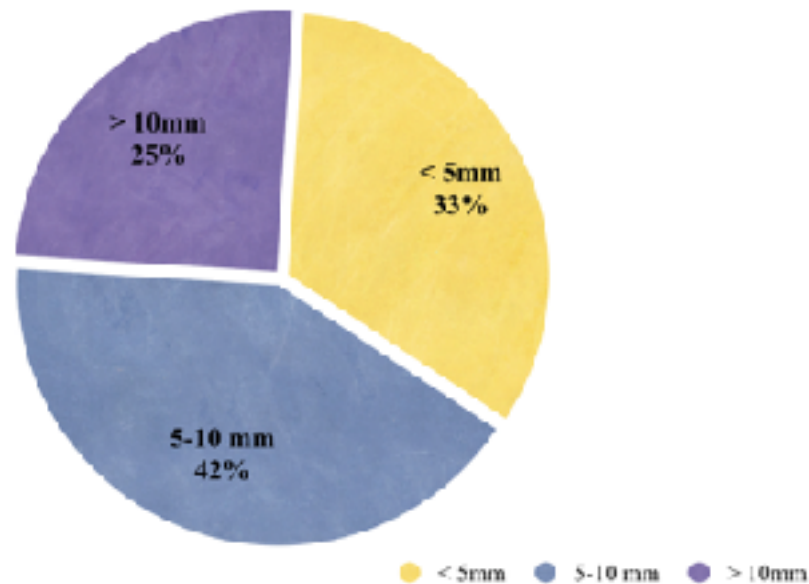
Las distintas localizaciones de las lesiones se muestran en la gráfica 2, que se agruparon en 3 grupos de acuerdo al tipo de mucosa en el que se encontraron:

- Mucosa de revestimiento: Incluyendo la mucosa de la cara interna del labio, cara interna de las mejillas, suelo de la boca, cara ventral de la lengua y paladar blando. En este grupo se incluyeron 11 lesiones (30.5%).
- Mucosa especializada: Se encuentra en los 2/3 anteriores de la cara dorsal de la lengua. Se llama especializada porque en ella se encuentran los receptores de sabor. En este grupo se incluyeron 3 lesiones (8.3%).
- Mucosa masticatoria: Mucosa que recibe directamente las cargas de masticación: encía, área retromolar y paladar duro. En este grupo se incluyeron 22 lesiones (61.1%).



Gráfica 2: Localización de las lesiones.

Las lesiones también fueron categorizadas en 3 grupos según su tamaño y el tiempo que habían persistido en boca. En cuanto al tamaño, 12 lesiones fueron <5mm, 15 lesiones tenían un tamaño entre 5-10 mm y 9 lesiones medían más de 10mm, una de las cuales superaba los 20mm. Los porcentajes de los distintos tamaños eran 33.3%, 41.7% y 25% respectivamente (gráfica 3).



Gráfica 3: Distribución de las lesiones según su tamaño.

La duración o persistencia de la lesión se obtuvo tanto de la historia clínica del paciente como de la información que el mismo nos aportaba. Con este parámetro no podemos obtener el tiempo real de persistencia de la lesión pero al menos podemos tener noción del tiempo transcurrido desde que se conoce que la lesión esta presente. De acuerdo a esta información, 19 lesiones se habían diagnosticado en los últimos 6 meses (52.8%), 8 lesiones entre los últimos 6-12 meses (22.2%) y 9 lesiones hacía más de 12 meses (25%). Los casos en los que los pacientes no supieron dar esta información, ya que el primer conocimiento sobre la lesión fue justo antes de ser referidos al departamento

de medicina oral, o en los que las historias clínicas no aportaban datos previos sobre la lesión, se incluyeron en el grupo de los primeros 6 meses.

Al analizar la localización de las lesiones, 4 de ellas (11.1%) se localizaron en el borde lateral de la lengua, y se consideraron de mayor riesgo de malignización dada la información obtenida de la literatura en cuanto al riesgo relacionado con la localización de la lesión. Tres de ellas clasificadas a su vez en el grupo de color blanco y una en el de color rojo. Una de las lesiones blancas además era la que medía 20mm.

Las características clínicas de las lesiones están resumidas en la tabla 6.

CARACTERÍSTICA		n (%)
<b>Color</b>	Blanco	26
	Blanco-rojo	9
	Rojo	1
<b>Localización</b>	<u>Mucosa Revestimiento:</u>	<u>11</u>
	Borde lateral de la lengua	4
	Paladar blando	1
	Mucosa bucal	6
	<u>Mucosa Especializada:</u>	<u>3</u>
	Dorso lingual	<u>22</u>
	<u>Mucosa Masticatoria:</u>	4
	Encía	2
	Reborde alveolar	3
	Paladar duro	13
	Mucosa retromolar/trígono	
	<b>Riesgo de malignización: alto</b>	4
<b>Tamaño</b>	< 5 mm	12
	5-10 mm	15
	> 10 mm	9
<b>Duración</b>	< 6 meses	19
	6-12meses	8
	> 12 meses	9

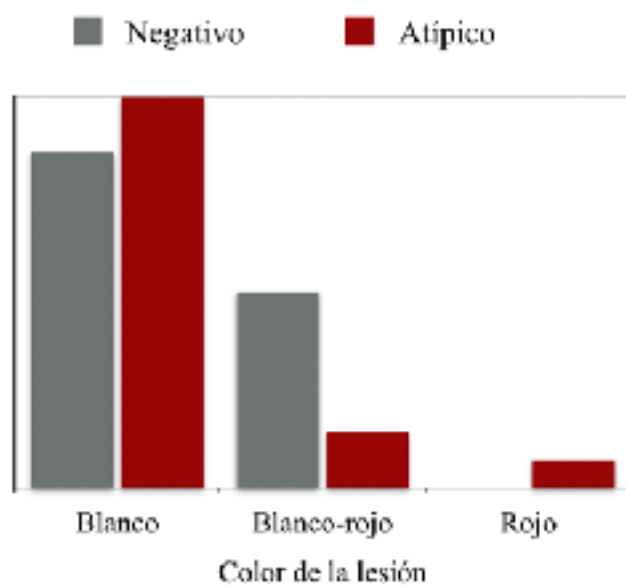
Tabla 6: Características de las lesiones (n=36).

## **2. RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA BIOPSIA POR CEPILLADO (OralCDx®)**

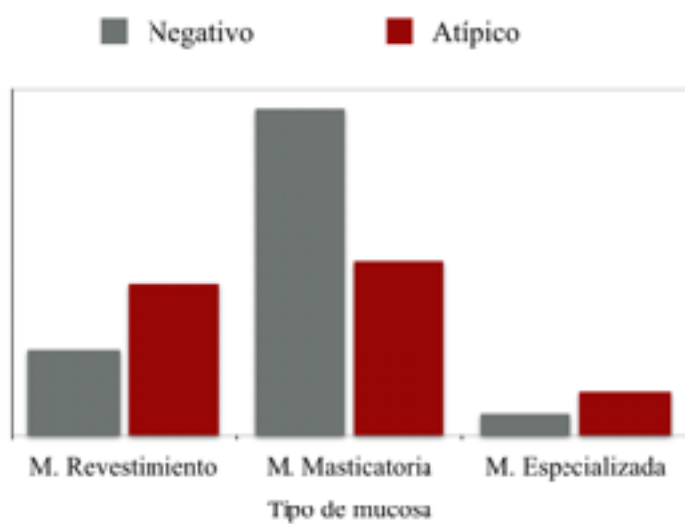
Las 36 lesiones analizadas con el sistema OralCDx® mostraron los siguientes resultados: 19 casos “negativo” y 17 casos “atípico”, 52.7% y 47.3% respectivamente. No se observó ningún resultado “positivo” o “incompleto”.

Los resultados “atípico” se observaron en 12 lesiones de mujeres (54.5%) y en 5 lesiones en hombres (35.7%). En pacientes fumadores se observó 10 resultados “atípico” mientras que en no fumadores 7. En el grupo de fumadores, 7 de los 10 resultados “atípico” se dieron en el grupo de pacientes que fumaba más de 20 cigarrillos al día. El grupo de pacientes que consumía alcohol presentó resultados “atípico” en 6 lesiones (54.5%) y en el grupo que no consumía alcohol se observaron 11 casos (44%).

En cuanto a las características de la lesión, se observó un resultado “atípico” en 14 lesiones blancas (53.8%), en 2 lesiones blanco-rojas (22.2%) y también en la única lesión roja que se analizó en este estudio (gráfica 4). El mismo resultado se observó en 2 lesiones en la mucosa especializada (66.6%), 7 lesiones procedentes de mucosa de revestimiento (63.6%), 8 lesiones procedentes de mucosa masticatoria (36.4%) (gráfica 5); así como en 3 de las 4 lesiones que consideramos de alto riesgo de malignización al estar localizadas en el lateral de la lengua (75%). Por último, se observaron 3 casos “atípico” en lesiones de tamaño inferior a 5mm (25%), en 8 lesiones de tamaño entre 5-10mm (53.3%) y en 6 lesiones de más de 10mm (66.7%) (gráfica 6).

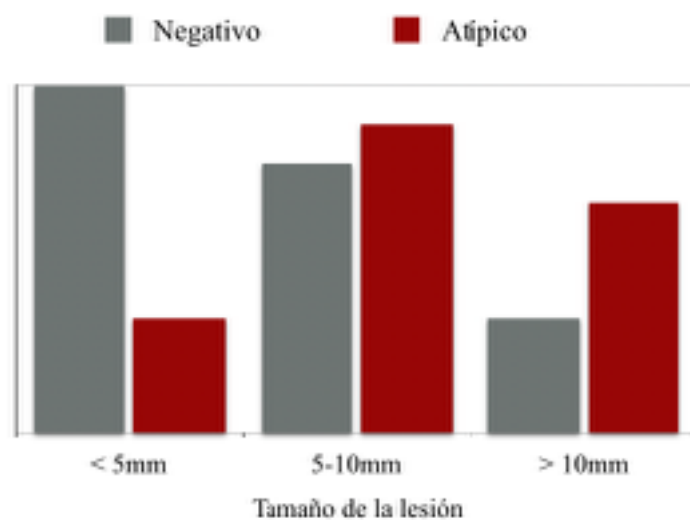


Gráfica 4: Distribución de resultados OralCDx® según el color de la lesión.



Gráfica 5: Distribución de resultados OralCDx® según el tipo de mucosa donde se encuentra la lesión.





Gráfica 6: Distribución de resultados OralCDx® según el tamaño de la lesión.

### 3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON AMBAS TÉCNICAS

En la tabla de contingencia de 2x2 (tabla 7) se puede observar la concordancia entre el resultado obtenido con el sistema Oral CDx® y el análisis histopatológico. Ninguna muestra se consideró inadecuada y por tanto las 36 muestras fueron válidas para realizar ambos análisis.

Prueba		Biopsia con bisturí (Gold standard)		Total
		Displasia	Benigno	
Biopsia por cepillado (OralCDx®)	“Atípico”	8	9	17
	“Negativo”	2	17	19
Total		10	26	36

Tabla 7: Tabla de contingencia para el resultado “atípico” obtenido con el test Oral-CDx®

Las 36 lesiones analizadas con el sistema OralCDx® mostraron los siguientes resultados: 19 casos “negativo” y 17 casos “atípico”, mientras que el análisis histopatológico a partir de la biopsia por bisturí mostró 10 casos con presencia de displasia y 26 casos con ausencia de displasia. Ocho resultados fueron verdaderos positivos, es decir, la prueba índice (Oral CDx®) mostraba presencia de células displásicas y el test de referencia (biopsia con bisturí) determinaba presencia de displasia. Diecisiete casos fueron verdaderos negati-

vos, mostrando ausencia de displasia con ambos test. Se observó dos falsos-negativos, es decir, dos lesiones en las que el test Oral CDx® no detectó atipia celular pero el análisis patológico realizado a partir de la biopsia con bisturí detectó presencia de displasia. Por otro lado, se observó 9 falsos-positivos, es decir, 9 lesiones en las que el test Oral CDx® detectó atipia celular pero el análisis patológico determinó que no había presencia de displasia. En total hubo 11 resultados no coincidentes (30.5%) y 25 casos con el mismo diagnóstico con ambas pruebas (69.44%).

Los dos falsos negativos fueron diagnosticados clínicamente como leucoplasia, e histopatológicamente como displasia leve uno y displasia moderada el otro. Los nueve falsos positivos, fueron diagnosticados histopatológicamente como: 4 leucoplasias, 3 LPO, 1 granuloma piógeno y un papiloma escamoso debido a una infección viral; todos ellos sin presencia de displasia.

A partir de la tabla de contingencia se obtuvo para la prueba índice OralCDx® un 80% de sensibilidad (S), un 65.4% de especificidad (E), los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) fueron 47% y 89.5% respectivamente. Los coeficientes de probabilidad (*Likelihood ratio*) positivo y negativo (CPP y CPN) fueron 2.31 y 0.31 respectivamente. Estos datos con sus correspondiente intervalo de confianza al 95 % se reflejan en la tabla 8.

Sensibilidad	80%	(95% CI: 44.22–96.46%)
Especificidad	65,38%	(95% CI: 44.36–82.06%)
Valor Predictivo Positivo	47,06%	(95% CI: 23.86–71.47%)
Valor Predictivo Negativo	89,47%	(95% CI: 65.46–98.16%)
Cociente de Probabilidad Positivo	2,31	(95% CI: 1.25–4.26)
Cociente de Probabilidad Negativo	0,31	(95% CI: 0.09–1.09)

Tabla 8: Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y cocientes de probabilidad para la prueba índice OralCDx® con el índice de confianza 95%.

Once muestras se seleccionaron de forma aleatoria para analizar la concordancia entre el patólogo que realizaba el análisis al microscopio con el tejido obtenido por biopsia con bisturí y otro patólogo de referencia. El análisis de concordancia inter-examinador presento un índice kappa de 22.5% (ligera concordancia).

## DISCUSSION

---

## V DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*; WHO) ha estimado que el cáncer oral tiene una de las tasas de mortalidad más altas de las observadas en general en este tipo de patologías. Desgraciadamente, la mayor parte de los cánceres de la cavidad oral carecen de signos claramente visibles en sus estadios iniciales y por tanto, independientemente de los avances en el diagnóstico y de los distintos tipos de tratamientos, estos pacientes siguen teniendo mal pronóstico. Esto supone que los pacientes son diagnosticados de cáncer oral en los estadios más avanzados de la enfermedad. Como ya se hace en otros tipos de cánceres, la clave para disminuir el sufrimiento de los pacientes e incrementar su supervivencia es la detección precoz. Para ello, cada vez se desarrollan más programas de *screening* para detectar la enfermedad en estadios iniciales (Kujan et al., 2005). En España, según los datos recogidos en 2012 por la Sociedad Española de Oncología, la incidencia de cáncer oral es 1.9%, la mortalidad es 1.1% y la prevalencia estimada a 5 años es 2% (SEOM, 2012).

La detección precoz del cáncer oral está ligada directamente con la detección y diagnóstico de las lesiones potencialmente malignas. Estas se definen como: aquellas lesiones que, habiendo sido identificadas inicialmente como *lesiones precancerosas*, se ha podido observar su malignización a lo largo del seguimiento en estudios longitudinales, se ha visto coexistencia en los márgenes de COCE evidentes, se han detectado alteraciones morfológicas y citológicas similares a las observadas en lesiones epiteliales malignas pero sin haber invadido el tejido conectivo y se han podido identificar algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en carcinomas orales claramente invasivos. Dentro de este concepto se incluyen todas las presentaciones clínicas que conllevan riesgo de malignizarse, unificando le-

siones y condiciones precancerosas. Entre ellas destacan leucoplasia, liquen plano oral (LPO), fibrosis oral submucosa y eritroplasia (Warnakulasuriya et al., 2007).

La detección precoz de las lesiones orales potencialmente malignas, y por tanto de cáncer oral, es de elevada importancia, y numerosos métodos diagnósticos se han propuesto para ello: examen oral, medios de tinción directa, citología oral, espectroscopía, tomografía, espectroscopía fluorescente... (Steele y Meyers, 2011). Igual que ocurre con las nuevas tecnologías médicas, las nuevas pruebas diagnósticas deben evaluarse con detalle antes de su introducción en la práctica clínica. El proceso riguroso de evaluación de precisión diagnóstica de estas pruebas antes de su aceptación no sólo reduce el número de consecuencias clínicas no deseadas, secundarias a las estimaciones erróneas de la precisión diagnóstica de la prueba, sino que también limita los costes sanitarios, ya que evita la realización de pruebas innecesarias.

Dentro de las nuevas técnicas estudiadas encontramos el sistema OralCDx®, que consiste en un método diagnóstico que se realiza en la consulta con el que se toma una biopsia transepitelial por cepillado para ayudar en la detección precoz de lesiones potencialmente malignizables. Puede ser de gran ayuda en la determinación de la verdadera naturaleza de las lesiones de la cavidad oral que de ninguna otra forma serían biopsiadas o analizadas en laboratorio, es decir, lesiones que, en la inspección visual, no son lo suficientemente sospechosas como para realizar una biopsia con bisturí. De acuerdo a lo publicado en la literatura, no existe suficiente evidencia para apoyar o rechazar la utilización del *test* OralCDx® como método adyuvante. Se mantiene la falta de certeza sobre la precisión de este *test* diagnóstico (Kujan et al., 2005, Lingen et al., 2008). El OralCDx® no pretende sustituir la biopsia oral tradicional, sino identificar aquellas lesiones que puedan requerir evaluación histológica

pero que la apariencia clínica no sea suficiente como para justificar una biopsia con bisturí. Éste, sigue siendo el test diagnóstico de referencia o *gold-standard* para obtener muestras y realizar el análisis patológico de las lesiones de la mucosa oral que sugieran o no premalignidad o malignidad, salvo en situaciones de contra-indicación absoluta de cirugía/biopsia tisular con bisturí.

Esta técnica de biopsia por cepillado se inspira en las citologías cervicales de las que se obtiene un frotis para analizar cambios malignos en la mucosa de forma precoz, así como infecciones víricas y fúngicas. Con el cepillo conseguimos obtener células de todos los estratos del epitelio oral que pueden ser analizadas con avanzados programas de ordenador o incluso puede servir para análisis molecular (Mendes et al., 2011). Este tipo de biopsia por cepillado ha demostrado ser un método fiable a la hora de detectar displasia en el epitelio cervical, al utilizarse en el epitelio oral los resultados son aún dudosos, y por otro lado ha demostrado no ser un método preciso a la hora de detectar cáncer y lesiones potencialmente malignas en la región de las amígdalas (Franceschi et al., 2015).

El objetivo principal del presente estudio era realizar un estudio de precisión diagnóstica del test OralCDx® y compararla con la biopsia convencional con bisturí considerada como el *gold standard*, en la detección de presencia de displasia en lesiones orales clínicamente benignas. Se reclutaron 36 pacientes de forma no consecutiva en el departamento de Estomatología III, Medicina y Cirugía Bucofacial, de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, todos ellos con una lesión clínicamente benigna. Se ha observado en varios estudios que el diagnóstico de lesiones orales potencialmente malignas realizado por un grupo de odontólogos especialistas es más preciso que cuando lo realizan médicos generales (Reddy et al., 2012, Poate et



al., 2004). En el presente estudio 5 especialistas fueron los encargados de realizar el diagnóstico clínico y ambos tipos de biopsias.

Tras el análisis con el sistema OralCDx® obtuvimos 19 casos “negativo” y 17 casos “atípico”, ninguna muestra dio un resultado “positivo” o “inadecuado”. Al comparar los resultados con los obtenidos con la biopsia con bisturí, observamos 8 verdaderos positivos, 17 verdaderos negativos, 2 falsos negativos y 9 falsos positivos. En total hubo 11 resultados no concordantes (30.5%) y 25 casos con el mismo diagnóstico con ambas pruebas (69.44%). A partir de la tabla de contingencia se obtuvo para la prueba índice OralCDx®: S fue 80%, E fue 65.4%, VPP y VPN fueron 47% y 89.5% respectivamente. Los CPP y CPN fueron 2.31 y 0.31 respectivamente.

Al analizar la literatura, observamos discrepancias entre los diferentes artículos no sólo en la metodología sino en cuanto a los resultados obtenidos. En la tabla 9 podemos ver los resultados obtenidos con otros estudios.

Una de las principales diferencias entre nuestro estudio y los previamente publicados es el tipo de lesiones que se analizan. La mayor parte de los estudios incluyen lesiones clínicamente sospechosas de malignidad (Sciubba, 1999, Christian, 2002, Scheifele et al., 2004, Poate et al., 2004, Hohlweg-Majert et al., 2009, Casparis et al., 2014). Se entiende que los pacientes con lesiones clínicamente benignas se beneficiarían más de nuevas técnicas no invasivas que aquellos pacientes que tienen lesiones que, debido a su aspecto clínico “sospechoso”, recibirían una biopsia. En los últimos años la tendencia ha sido analizar lesiones clínicamente benignas con OralCDx® para validar su capacidad diagnóstica (Mehrotra et al., 2011, Reddy et al., 2012, Seijas-Naya et al., 2012), y en el presente estudio únicamente se han analizado lesiones orales

clínicamente benignas, es decir, aquellas que no recibirían tratamiento sino seguimiento por parte del especialista.

<i>ESTUDIO</i>	<i>N</i>	<i>ÁREA GEO- GRÁFICA</i>	<i>TIPO DE LE- SION</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>
Sciubba, 1999	29	USA	Sciubba II	96%	97% 90%	-	-
Christian, 2002	89	USA	Lesiones clíni- camente benignas	-	-	-	-
Scheifele et al. 2004	98	Alemania	Leucoplasia, Liquen plano oral, COCE	61.5% 92.3%	97.1% 94.3%	-	-
Poate et al. 2004	44	Reino Unido	Lesiones clíni- camente sospe- chosas	71%	32%	44%	60%
Hohlweg- Majert et al. 2009	75	Alemania	Leucoplasia, Liquen plano oral, COCE	52%	29%	63%	21%
Mehrotra et al. 2011	79	India	Lesiones clíni- camente benignas (Sciubba II)	96%	100% 90.4%	84%	98%
Reddy et al. 2012	60	India	Leucoplasia	44%	81%	58%	89%
Seijas- Naya et al. 2012	24	España	Leucoplasia	73%	92%	89%	80%
Casparis et al. 2014	36	Suiza	Leucoplasia, Liquen plano oral, Eritropla- sia COCE	90%	44%	47%	88%
S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor pre- dictivo negativo							

Tabla 9: Estudios de validación diagnóstica de OralCDx®.

Parece ser que esta discrepancia en el tipo de lesiones analizadas afecta directamente los resultados obtenidos con OralCDx®: En el presente estudio se obtuvieron únicamente resultados “atípico” con el test OralCDx® y ningún resultado “positivo”. Sin embargo, otros estudios que han obtenido resultados “positivo” y no solo “atípico” son aquellos en los que se ha incluido todo tipo de lesiones, clínicamente benignas y/o con apariencia sospechosa, obteniendo así resultados “positivo” con frecuencia (Sciubba, 1999, Scheifele et al., 2004, Poate et al., 2004, Hohlweg-Majert et al., 2009, Casparis et al., 2014). Todos estos estudios presentan una posterior confirmación de COCE en sus muestras.

El test OralCDx® ha demostrado tener una alta S y E para detectar cambios displásicos epiteliales en lesiones clínicamente sospechosas, pero cuando se analizan lesiones clínicamente benignas, la precisión diagnóstica se reduce y la tasa de falsos negativos aumenta (Lingen et al., 2008). Se explica por tanto, que la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los estudios que incluyen todo tipo de lesiones encontradas en la cavidad oral no serían comparables con los de estudios que analizan únicamente lesiones benignas. Los valores de estos parámetros son mayores en aquellos estudios que incluían lesiones clínicamente sospechosas (Sciubba, 1999, Scheifele et al., 2004, Poate et al., 2004, Hohlweg-Majert et al., 2009, Casparis et al., 2014) que aquellos que sólo analizaban lesiones clínicamente benignas (Reddy et al., 2012, Mehrotra et al., 2011, Seijas-Naya et al., 2012), incluso los valores de estos estudios eran mayores cuando se analizaba sensibilidad, especificidad y valores predictivos sólo para los valores “positivo” eliminando los “atípico” de la ecuación (Sciubba, 1999, Scheifele et al., 2004).

Se ha determinado que la aparición de los falsos negativos se puede deber a un error topográfico de la toma de biopsias, es decir, si se toman biopsias de localizaciones distintas de una misma lesión. Se debe tener en cuenta que la

displasia es una lesión multicéntrica y no tiene por qué estar extendida en el mismo grado a lo largo de toda la lesión. El tiempo entre biopsias también parece estar relacionado directamente con una mayor discrepancia de los resultados de OralCDx® y biopsia con bisturí, tanto en falsos positivos como en falsos negativos (Mehrotra et al., 2011). En el presente estudio sólo se observaron 2 falsos negativos, posiblemente debido a que ambas biopsias fueron realizadas en todas las muestras independientemente de su resultado y sin dejar ningún intervalo de tiempo entre ellas. Ambos presentaban un grado de displasia leve al análisis microscópico.

Por otro lado, un factor que deriva en un alto número de falsos positivos con el test OralCDx® es la presencia de inflamación en las lesiones. Debido a la inflamación, la morfología celular se ve alterada y la imagen observada puede ser compatible con displasia (Sciubba, 1999, Trullenque-Eriksson et al., 2009, Seijas-naya et al., 2012). En el presente estudio, uno de los falsos positivos resultó ser un papiloma escamoso debido a una infección viral.

La variable principal utilizada ha sido la presencia de displasia, variable también seleccionada en el resto de estudios publicados en la literatura. Se define como displasia epitelial al conjunto de alteraciones arquitectónicas (estratificación alterada) y celulares (atipias celulares) que sufre el epitelio tendiendo a la malignización (Kuffer y Lombardi, 2002). Como se ha explicado en la introducción, la displasia epitelial es la alteración definitiva por la cual se considera que el epitelio normal adquiere una situación de enfermedad. Se detecta al microscopio y se considera un factor de riesgo para la transformación maligna (Kujan et al., 2003). La displasia puede presentarse en varios grados dependiendo de la cantidad de alteraciones (diferenciación celular) que presente el epitelio analizado. Actualmente la clasificación de la WHO de 2005 es la

más utilizada y subdivide la presencia de displasia en: displasia leve, moderada, severa y carcinoma *in situ* (Barnes et al., 2005).

La variabilidad inter- e intra-examinador que existe a la hora de realizar el diagnóstico patológico, no sólo de presencia de displasia sino también del grado de la misma, influye en la presencia de resultados no concordantes (Svirsky et al., 2002, Eisen y Frist 2003, Scheifele et al., 2004). Normalmente, con la finalidad de determinar la especificidad (E), se asume que cuando a partir de la biopsia por cepillado se obtiene un resultado de displasia que no es detectado a partir de la biopsia con bisturí, se clasifica como falso positivo, aunque no hay que olvidar que el resultado obtenido a partir de la biopsia con bisturí no es infalible y pueden darse falsos positivos y negativos en el análisis patológico.

El diagnóstico de displasia no es fácilmente reproducible entre patólogos orales y se ha observado en la literatura poca concordancia intra- e inter-examinador entre patólogos, por tanto un resultado discrepante entre biopsia por cepillado y biopsia con bisturí puede representar también un falso negativo o positivo asociado al diagnóstico e interpretación del patólogo a partir de una muestra tomada con bisturí (Mehrotra et al., 2011). En el presente estudio, se seleccionaron 11 muestras al azar que fueron examinadas por un segundo patólogo para valorar la concordancia inter-examinador para la variable principal: “presencia de displasia”. En índice Kappa que se obtuvo fue de 22.5%, es decir se obtuvo una “ligera concordancia” que demuestra la distinta interpretación que puede realizar otro profesional, resaltando la dificultad de alcanzar un alto grado de concordancia entre patólogos para la presencia de displasia. Además se ha demostrado que el grado de acuerdo inter-examinador es más difícil de alcanzar en estadios iniciales de displasia (Lingen et al., 2008, Fleskens y Slootweg, 2009), lo que explicaría la ligera concordancia obtenida en

este estudio. Esto se debe en parte a la ausencia de calibración para la determinación del grado de displasia y el desconocimiento acerca de qué criterios dentro de los que describen la displasia, son los que nos ayudan a determinar con mayor precisión el riesgo de futura transformación maligna. Esto es en muchas ocasiones motivo de frustración de patólogos (Bouquot et al., 2006).

Numerosos factores pueden alterar el grado de displasia en el epitelio escamoso y hacer que cambie en el tiempo, dificultando aún más su diagnóstico. Esto incluye la duración de la lesión, la edad del paciente, la localización intraoral, hábitos de riesgo como fumar o beber, infección por hongos, sobre todo del tipo *Candida*, y por virus, en especial el papilomavirus. Incluso si la lesión ha permanecido en la cavidad oral durante décadas, puede haber cambios tanto a peor como a mejor, y estos hechos no han sido estudiados de forma adecuada.

La localización de la que se toma la biopsia también condiciona el diagnóstico del patólogo: por ejemplo, en aquellas localizaciones en las que la mucosa es normalmente fina o atrófica, como el suelo de la boca o la cara ventral de la lengua, cualquier clasificación de gradación de displasia simplemente subestima el riesgo, ya que suelen presentar un grado bajo de displasia. En estos casos, muchos patólogos comunican su preocupación por el alto riesgo de malignidad mas allá de informar de los hallazgos histopatológicos (Warnakulasuriya et al., 2008).

La presencia de *Candida* en el epitelio parece contribuir a la aparición de hiperplasia e inflamación adicional en el epitelio que pueden dificultar la detección de displasia. En un estudio reciente se observó que el 48% de las biopsias tomadas que presentaban *Candida*, también mostraban displasia (McCullough et al., 2002). La relación entre displasia del epitelio oral e infec-

ción por el virus del papiloma humano no está tan clara como ocurre con la presencia de displasia en el epitelio cervical, aunque en los últimos años se ha observado que la detección de subtipos de dicho virus distintos al VPH-16 en pacientes con COCE, está relacionada con una menor tasa de supervivencia (Mazul et al., 2016).

Otra gran discrepancia entre los estudios es el momento de toma de las biopsias. En el presente estudio ambas biopsias, OralCDx® y biopsia por bisturí, fueron tomadas en todas las lesiones en el mismo día, pero al analizar la literatura, en casi todos los estudios hay discrepancias en el momento de la toma de las biopsias, siendo en algunos casos en el mismo momento de la biopsia por cepillado (Mehrotra et al., 2011, Speight et al., 2015), y en otros transcurren semanas e incluso meses entre ambos tipos de biopsias (Sciubba, 1999, Seijas-Naya et al., 2012, Casparis et al., 2014). Las limitaciones de comparar 2 biopsias realizadas en distinto momento se reflejan en un estudio en el que se analizaron 200 pacientes con lesiones diagnosticadas clínicamente como leucoplasia (Lee et al., 2007). En este estudio fueron tomadas distintas biopsias con bisturí de la misma localización con intervalo variable entre ellas y se observó un grado de acuerdo del 56%, demostrando que el tomar un mismo tipo de biopsia de la misma lesión no es fiable al dejar un intervalo de tiempo entre ellas. En otro estudio realizado por Holmstrup y colaboradores, se comparó el grado de displasia de 101 biopsias incisionales de lesiones orales con el grado de displasia obtenido del espécimen completo resecionado con biopsia excisional, y se obtuvo un grado de concordancia del 49%, demostrando que el diagnóstico patológico varía según el tipo de biopsia con bisturí que se obtenga y la zona de la lesión que se analice (Holmstrup et al., 2007). Se debe tener en cuenta que la naturaleza de la lesión puede variar a lo largo del tiempo produciéndose la desaparición de la displasia en zonas donde había o apareciendo displasia en lesiones que previamente no presentaban (Bouquot

y Whitaker, 1994). Por tanto parecería lógico pensar que si se va a realizar una comparación de dos tipos distintos de biopsia, con bisturí y por cepillado, ambas biopsias deberían realizarse en la misma zona de la lesión y en el mismo momento de cara a reducir sesgos (Eisen y Frist 2003, Koch et al., 2011), pero en las lesiones orales, la displasia es multicéntrica y por tanto realizar las 2 biopsias en el mismo sitio de la lesión podría dar un resultado discrepante.

Desafortunadamente la variabilidad en el diagnóstico patológico también influye en el verdadero diagnóstico. Cuando en los estudios solo las lesiones que son sospechosas clínicamente se someten a confirmación histológica, los falsos negativos no se pueden calcular, y faltarían datos para el cálculo correcto de sensibilidad, especificidad y valores predictivos sobre el diagnóstico de displasia (Epstein et al., 2012). En el presente estudio se realizaron ambos tipos de biopsias en todas las lesiones, pero en estudios previamente publicados no se ha seguido esta metodología, y es una de las razones por las que la validez diagnóstica de la citología por cepillado sigue sujeta a controversia (Schefe et al., 2004).

Para poder comparar este estudio con aquellos anteriormente publicado, en principio se seleccionarían los estudios realizados únicamente con lesiones clínicamente benignas (Mehrotra et al., 2011, Reddy et al., 2012, Seijas-Naya et al., 2012). Estos estudios se comparan en la tabla 10.



<i>ESTUDIO</i>	<b>Mehrotra et al. 2011</b>	<b>Reddy et al. 2012</b>	<b>Seijas-Naya et al. 2012</b>	<b>Presente estudio</b>
<i>ÁREA GEO-GRÁFICA</i>	India	India	España	España
<i>CASOS</i>	79	60	24	36
<i>EDAD</i>	45.5(25-75)	48.9 (29-70)	62.38 (40-82)	51.57 (18-80)
<i>SEXO</i>	30:55	11:49	12:12	20:16
<i>TABACO</i>	37 (44%)	60 (100%)	15 (62.5%)	18 (50%)
<i>ALCOHOL</i>	9 (11%)	32 (53.3%)	9 (37.5%)	11 (30.5%)
<i>TIPO DE LESION</i>	Lesiones clínicamente benignas	Leucoplasia	Leucoplasia	Lesiones clínicamente benignas
<i>LOCALIZACIÓN MÁS FRECUENTE</i>	Mucosa bucal	Mucosa bucal	Lateral de la lengua	Mucosa bucal
<i>INTERVALO ENTRE BIOPSIAS</i>	Nulo	No se especifica	3 semanas	Nulo
Sexo: Mujer:Hombre Edad: Edad media (rango edad mínima-máxima)				

Tabla 10: Estudios que analizan lesiones clínicamente benignas.

Dos de los estudios fueron realizados en la India y otro en España. En este tipo de estudios no se pueden extrapolar los datos a distintas poblaciones ya que las características demográficas y la prevalencia de la enfermedad son completamente distintas. Mientras que en la India la prevalencia del cáncer oral es del 40% de los cánceres que se diagnostican (Mehrotra et al., 2011), en España es del 2% (SEOM, 2012). La edad de los pacientes en el presente estudio se encuentra entre los 18 y los 80 años, los otros tres estudios mostraban en

general población más adulta y destaca el estudio de Seijas-Naya y colaboradores en el que la población es mayor, con una edad media 10 años más que los otros tres estudios. En cuanto al sexo de los pacientes, excepto en el estudio de Reddy y colaboradores, el resto presentan mayor porcentaje de mujeres. En relación a los hábitos nocivos, cabe destacar el estudio de Reddy y colaboradores en el que el 100% de los pacientes fumaban, 3 pacientes (mujeres) fumaban invertido, y la mitad de la muestra además consumía alcohol de forma regular. El uso de tabaco y alcohol en el presente estudio se observó en el 50% y 30.5% de los pacientes respectivamente, ambos porcentajes en los otros dos estudios también son más reducidos: 44% y 62% para tabaco y 11% y 37% para consumo de alcohol al compararlos con los del estudio de Reddy y cols. La única similitud entre estudios es el porcentaje de consumo de alcohol en nuestro estudio y el otro estudio realizado también en España: 30.5% y 37.% respectivamente, siendo del mismo modo el porcentaje de pacientes fumadores relativamente similar: 50% y 62% respectivamente.

En el presente estudio, igual que en el de Mehrotra y colaboradores, se incluyeron todo tipo de lesiones orales clínicamente benignas, compatibles con leucoplasia, eritroplasia, LPO... aunque en ambos estudios, el diagnóstico clínico más común fue la leucoplasia. En el caso de estudios como Seijas-Naya y colaboradores y Reddy y colaboradores sólo incluyeron lesiones de leucoplasia. Aunque se ha descrito que dentro de las lesiones potencialmente malignas la más común es la leucoplasia (Petti, 2003), al incluir sólo este tipo se excluyen otras lesiones como la eritroplasia que es la que tiene mayor tasa de malignización y por tanto es necesario diagnosticar a tiempo (Panwar et al., 2014). La localización de la lesión observada con mayor frecuencia en los estudios fue la mucosa bucal/yugal, excepto en el estudio de Seijas-Naya y colaboradores que fue el borde lateral de la lengua. Esta localización se ha descrito en la literatura como una zona de alto riesgo de malignización (Ho et al.,

2012), pero en este estudio no se observó ningún resultado “positivo” con el test OralCDx® ni resultado de displasia severa o carcinoma *in situ*. Los autores tampoco reflejaron en los resultados si estas localizaciones estaban relacionadas con un resultado de presencia de displasia, y reconocen en la discusión que este dato no concuerda con lo descrito en la literatura y que puede deberse al pequeño tamaño muestral.

El cuanto al momento de toma de biopsias, en el presente estudio la biopsia con OralCDx® y con bisturí fue realizada el mismo día por el mismo examinador, ya que de esta forma parece que se evitarían sesgos tomando una muestra de tejido más adecuada y facilitando la interpretación de los datos por parte del patólogo (Lingen et al., 2008). En el estudio de Mehrotra y colaboradores la metodología fue la misma que seguimos nosotros, tomando ambas biopsias en la misma sesión (Mehrotra et al., 2001). En el estudio de Reddy y colaboradores también se realizó primero la biopsia con OralCDx® y después la biopsia con bisturí pero no especifican qué intervalo dejaron entre ambas (Reddy et al., 2012), y esto puede modificar los resultados finales (Lee et al., 2007). En el estudio de Seijas-Naya y colaboradores en algunos pacientes se tomó primero la biopsia con el sistema OralCDx® y 3 semanas después la biopsia con bisturí, y en otras lesiones de leucoplasia de las que ya se había tomado una biopsia con bisturí, tras 3 semanas se tomó una biopsia con OralCDx® (Seijas-Naya et al., 2012). En este caso, y considerando las discrepancias encontradas cuando el protocolo de las biopsias no se realizan en el mismo momento y en el mismo orden (Eisen y Frist, 2003, Lee et al., 2007, Kock et al., 2011, Speight et al., 2015), consideramos que los resultados de este estudio podrían estar sesgados.

Tras analizar las diferencias metodológicas de los estudios anteriores, la comparación de los resultados es bastante limitada. En general en los estudios,

los niveles de sensibilidad (S) son más bajos que los niveles de E. Una prueba diagnóstica *más específica*, significa que tiene mayor capacidad de identificar aquellos individuos que están “sanos”, es decir, los resultados negativos. Estas pruebas son preferibles cuando el estar “enfermo” supone una situación grave ya que es importante saber que no se tiene la “enfermedad”. En el caso de la biopsia por cepillado con OralCDx® de las lesiones orales potencialmente malignas, se precisa de una prueba *específica* de modo que cuando obtengamos un resultado “negativo” se pueda admitir que no hay presencia de displasia. Cuando se obtenga un resultado “positivo/atípico” éste debe ser confirmado siempre con una biopsia con bisturí, por lo tanto una prueba más *sensible* supondría una mejor detección de los casos “enfermos” que es importante en aquellos test utilizados como herramientas de *screening*. En el presente estudio, se obtuvo una baja E de 65%, más baja que en los otros estudios (Mehrotra et al., 2011, Reddy et al., 2012, Seijas-Naya et al., 2012), y una S de 80% sólo superada por los resultados del estudio de Mehrotra y colaboradores.

Los valores de E y S son parámetros de validez interna de una prueba, y para relacionar estos parámetros con la prevalencia de la presencia de displasia en la población, se calculan los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN): 47% y 89% respectivamente. Estos valores se consideran aceptables cuando se encuentran por encima del 80%. En el caso del VPP, la probabilidad de que un sujeto con resultado “atípico” tenga en realidad presencia de displasia es del 47%. Esto podría estar relacionado con el hecho de que cuanto más inicial es el estadio de displasia, más difícil es su detección (Fleskens y Slootweg, 2009). En el caso del VPN en nuestro estudio, se interpretaría como un 89% de probabilidad de que un sujeto con resultado “negativo” tenga realmente ausencia de displasia. Estos dos parámetros no se pueden comparar entre distintas poblaciones, y el único estudio realizado en una población similar (España) tiene discrepancias metodológicas con nuestro estudio, de modo que

estos parámetros no se podrían comprobar. Los coeficientes de probabilidad positivo y negativo sólo fueron calculados en otro estudio de la literatura pero en este caso tampoco es comparable ya que este estudio incluye lesiones de COCE (Scheifele et al., 2004).

La revisión Cochrane, de ensayos clínicos prospectivos, realizada por Kujan y colaboradores, concluyó que no existen pruebas sólidas para sugerir que el test Oral CDx® es beneficioso o perjudicial como técnica coadyuvante al diagnóstico (Kujan et al., 2005), además existe gran discrepancia entre los estudios que han analizado su validez diagnóstica, ubicando los valores para S y E entre 71.4-100% y 32-100% respectivamente (Trullenque-Eriksson et al., 2009). La escasez de estudios clínicos en este campo puede atribuirse a diversos obstáculos como un seguimiento adecuado, la reproducibilidad del método estudiado, conformidad de pacientes y profesionales, costes, baja prevalencia de lesiones potencialmente malignas en determinadas regiones... Además, muchos de los estudios publicados aportan resultados muy prometedores centrándose más en la capacidad diagnóstica del nuevo test que en su uso como herramienta de *screening*.

Al igual que Oral CDx®, diferentes métodos de biopsia exfoliativa han sido desarrollados de manera que el dentista general pueda realizar una toma de muestra de una lesión sospechosa en la cavidad oral, facilitando el diagnóstico precoz de lesiones potencialmente malignas y COCE, con un método no invasivo. En un estudio realizado en la Universidad de Santiago de Compostela se analizó la eficacia de tres tipos de métodos de biopsia no invasivo para obtener material suficiente para análisis molecular. Compararon un sistema de raspado de mucosa con cureta, Cytobrush® y OralCDx®. La muestra obtenida con estos tres métodos fue apropiada para su análisis en el 80% de las obtenidas con OralCDx®, el 90.7% de las obtenidas con la cureta, y el 48.6% de las

obtenidas con Cytobrush®. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre Cytobrush® y los otros dos métodos. Además el sistema OralCDx® resultó ser menos agresivo que la cureta (Reboiras-Lopez et al., 2012).

Un componente fundamental del sistema OralCDx® es el análisis para detectar células displásicas que se realiza por ordenador. Este sistema ayuda en la búsqueda de alteraciones celulares que posteriormente serán interpretadas por un patólogo. Normalmente este tipo de alteraciones a veces pasan inadvertidas a los profesionales ya que la búsqueda de atipia celular, y sobretodo en lesiones iniciales, es una tarea intensiva para el patólogo que consume tiempo y energía. Lo que pretende este sistema de detección por ordenador, es realizar un primer *screening* celular facilitando el trabajo del patólogo. En los últimos años, estos métodos de análisis por imagen han ido adquiriendo mejoras de forma que hoy en día se usan, por ejemplo, para el análisis digital de imágenes radiológicas (radiografías de tórax y mamografías) o detección de alteraciones celulares en frotis epitelial de cérvix (Sciubba, 1999). Es importante que la interpretación de los datos obtenidos con la biopsia por cepillado sean realizadas por un patólogo formado. se ha observado que la interpretación de atipia celular en la mucosa oral es más complicado que en la mucosa de otras localizaciones (Allegra et al., 1973) por lo que los patólogos que trabajan con el sistema OralCDx® reciben una formación añadida a su especialización para reducir la variabilidad de sus resultados.

En la literatura sólo se ha observado la asociación de OralCDx® con el sistema de detección por ordenador de atipia celular, pero no hay estudios en la literatura que hayan estudiado OralCDx® en combinación con otras técnicas que pueden mejorar el diagnostico: técnicas moleculares (Lingen et al., 2008, Acha et al., 2005). Parece un método útil para aquellos pacientes que tienen múltiples lesiones orales y también en el seguimiento y control de pacientes

con antecedentes personales y/o familiares de cáncer oral (Lingen et al., 2008, Rethman y Philipsen, 2010).

Es necesaria la recogida longitudinal de datos y la realización de estudios clínicos con diseño prospectivo para evaluar la efectividad y precisión diagnóstica de la prueba OralCDx®.

## CONSLUSIONES



## VI CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se ha observado que mediante el sistema OralCDx® de biopsia por cepillado se detecta presencia de displasia, y que el grado de acuerdo con la biopsia convencional con bisturí es del 69.5%.
2. Se ha observado que el sistema OralCDx® puede ser utilizado para detectar displasia epitelial en lesiones orales potencialmente malignas de aspecto clínico no sospechoso.
3. Se ha obtenido una alta sensibilidad, 80%, y un alto valor predictivo negativo, 89.5% lo que sugiere que el test OralCDx® es efectivo al detectar casos iniciales de displasia como herramienta de *screening* y puede ayudar a seleccionar de forma no invasiva qué casos deberían ser biopsiados con la técnica de referencia.
4. El grado de acuerdo inter-examinador para la detección de “presencia de displasia” tras biopsia con bisturí fue de 22.5%

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadie, W.M., Partington, E.J., Fowler, C.B., and Schmalbach, C.E. (2015) Optimal management of proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review of the literature. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 153 (4), 504-511.
- Acha, A., Ruesga, M.T., Rodríguez, M.J., Martínez-de-Pancorbo M.A., and Aguirre, J.M. (2005) Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 10, 95-102.
- Al-Hashimi, I., Schifter, M., Lockhart, P.B., Wray, D., Brennan, M., Migliorati, C.A. et al. (2007) Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: Diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103 (S25), 1–12.
- Allegra, S.R., Broderick, P.A., and Corvese, N. (1973) Oral cytology. Seven year oral cytology screening program in the State of Rhode Island: analysis of 6448 cases. *Acta Cytol*, 17, 42-48.
- Bagan, J.V., Jimenez, Y., Sanchis, J.M., Poveda, R., Milian, M.A., Murillo, J., and Scully, C. (2003) Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 32, 379-382.
- Bánóczy, J., Gintner, Z., and Dombi, C. (2001) Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ*, 65, 322-327.

- Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P.A., and Sidransky, D. (2005) Pathology and genetics. Head and neck tumours. *World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon: IARC.
- Bascones, A. (2004) Liqueen bucal y otras lesiones blancas. En: *Medicina bucal*. Ed. por Bascones A. 3a ed. Madrid: Avances-ariel, 123-159.
- Bascones-Ilundain, C., González-Moles, M.A., Carrillo-de-Albornoz, and A., Bascones-Martínez, A. (2006) Liqueen plano oral (I). Aspectos clínicos, etiopatogénicos y epidemiológicos. *Av Odontoestomatol*, 22, 11-19.
- Batsakis, J.G., Suarez, P., and el-Naggar, A.K. (1999) Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. *Oral Oncol*, 35, 354-359.
- Bermejo-Fenoll, A., Sanchez-Siles, M., Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., and Salazar-Sanchez, N. (2009) Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from southeastern Spain. *Oral Oncol*, 45 (8), 54-56.
- Bosman, F.T. (2001) Dysplasia classification: pathology in disgrace? *J Pathol*, 194, 143-144.
- Bothwell, D.J., Lewis, D.W., Bradley, G., Leong, I., Jordan, R.C.K., Mock, D., and Leake, J.L. (2003) Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. *Community Dent Oral Epidemiol*, 31, 300-305.
- Bouquot, J.E., and Whitaker, S.B. (1994) Oral leukoplakia—rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or “phases”. *Quintessence Int*, 25 (2), 133-140.

- Bouquot, J.E., Speight, P.M., Farthing, P.M. (2006) Epithelial dysplasia of the oral mucosa—Diagnostic problems and prognostic features. *Current Diagnostic Pathology*, 12, 11–21.
- Canto, A.M., Müller, H., Freitas, R.R., Santos, P.S. (2010) Oral lichen planus (OLP): clinical and complementary diagnosis. *An Bras Dermatol*, 85: 669-675.
- Carozo, M., Broccoletti, R., Carbone, M., Gandolfo, S., Garzino, P., and Gasccio, G. (1996) Phenotypic análisis of peripheral blood cell immunity in Italian patients with varieties of oral lichen planus. *Bull Gropu Int Reach Sci Stomatol et Odontol*, 39, 33-38.
- Casparis, S., Borm, J.M., Tomic, M.A., Burkhardt, A., and Locher, M.C. (2014) Transepithelial brush biopsy - Oral CDx- A non-invasive method for the early detection of precancerous and cancerous lesions. *J Clin Dent Res*, 2 (2), 222-226.
- Casparis, S., Borm, J.M., Tektas, S., Kamarachev, J., Locher, M.C., Damerau, G., Grätz, K.W., and Stadlinger, B. (2015) Oral lichen planus (OLP), oral lichenoid lesions (OLL), oral dysplasia, and oral cancer: retrospective analysis of clinicopathological data from 2002–2011. *Oral Maxillofac Surg*, 19 (2), 149-156.
- Cerero-Lapiedra, R., Baladé-Martínez, D., Moreno-López, L.A., Esparza-Gómez, G., Bagán, J. (2010) Proliferative verrucous leukoplakia: A proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15 (6), 839-845.
- Chen, Y.W., Lin, J.S., Fong, J.H., Wang, I.K., Chou, S.J., Wu, C.H., Lui, M.T., Chang, C.S., and Kao, S.Y. (2007) Use of methylene blue as a diagnos-

tic aid in early detection of oral cancer and precancerous lesions. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 45, 590-591.

Christian, D.C. (2002) Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *JADA*, 133: 357-362.

Eisen, D., and Frist, S. (2005) The relevance of the high positive predictive value of the oral brush biopsy. *Oral Oncol*, 41 (7), 753-755, author reply 756.

Epstein, J.B., Güneri, P., Boyacioglu, H., Abt, E. (2012) The limitations of the clinical oral examination in detecting dysplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *JADA*, 143 (12), 1332-1342.

Farhi, D., and Dupin, N. (2010) Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol*, 28, 100-108.

Felefli, S., and Flaitz, C.M. (2000) The oral brush biopsy: it's as easy as 1, 2, 3. *Tex Dent J*, 117 (6), 20-24.

Fleskens, S., and Slootweg, P. (2009) Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head & neck oncology*, 1, 11.

Franceschi, S., Combes, J.D., Dalstein, V., Caudroy, S., Clifford, G., Gheit, T., Tommasino, M., Clavel, C., Lacau-St-Guilty, J., and Birembaut, P. (2015) Deep brush-based cytology in tonsils resected for benign diseases. *Int. J. Cancer*, 137, 2994–2999.

- Gandolfo, S., Castellani, R., and Pentenero, M. (2009) Proliferative verrucous leukoplakia: a potentially malignant disorder involving periodontal sites. *J Periodontol*, 80, 274-281.
- García-Peñín, A. (1990) Biopsia en Cirugía Bucal. En: *Cirugía Bucal: patología y técnica*. Ed. Donado, M. Madrid: Masson, 119-131.
- Greer, R.O. (2006) Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. *Otolaryngol Clin North Am*, 39, 249-275.
- Haya-Fernandez, M.C., Bagan, J.V., Murillo-Cortes, J., Poveda-Roda, R., and Calabuig, C. (2004) The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*, 10 (6), 346-348.
- Hashibe, M., Mathew, B., Kuruvilla, B., Thomas, G., Sankaranarayanan, R., Parkin, D.M., and Zhang, Z.F. (2000) Chewing tobacco, alcohol, and the risk of erythroplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9, 639-645.
- Hashibe, M., Jacob, B.J., Thomas, G., Ramadas, K., Mathew, B., Sankaranarayanan, R. and Zhang, Z.F. (2003) Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. *Oral Oncol*, 39 (7), 664-671.
- Hellquist, H., Cardesa, A., Gale, N., Kambic, V., Michaels, L. (1999) Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Patho-

logy. *Histopathology*, 34, 226–233.

Ho, M.W., Field, E.A., Field, J.K., Risk, J.M., Rajlawat, B.P., Rogers, S.N., Steele, J.C., Triantafyllou, A., Woolgar, J.A., Lowe, D., and Shaw, R.J. (2013) Outcomes of oral squamous cell carcinoma arising from oral epithelial dysplasia: rationale for monitoring premalignant oral lesions in a multidisciplinary clinic. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 51, 594-599.

Ho, M.W., Risk, J.M., Woolgar, J.A., Field, E.A., Field, J.K., Steele, J.C., Rajlawat, B.P., Triantafyllou, A., Rogers, S.N., Lowe, D., and Shaw, R.J. (2012) The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology*, 48, 969–976.

Hohlweg-Majert, B., Deppe, H., Metzger, M.C., Schumm, S., Hoefler, H., Kesting, M.R., Hölzke, F., and Wolff, K.D. (2009) Sensitivity and specificity of oral brush biopsy. *Cancer Invest*, 27 (3), 293-297.

Holmstrup, P., Vedtofte, P., Reibel, J., and Stoltze, K. (2006) Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*, 42, 461–474.

Holmstrup, P., Vedtofte, P., Reibel, J., and Stoltze, K. (2007) Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med*, 36 (5), 262-266.

Huber, M.A. (2010) White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. *Clin Dermatol*, 28, 262-268.



- Isaac, U., Issac, J.S., and Ahmed-Khoso, N. (2008) Histopathologic features of oral submucous brosis: a study of 35 biopsy specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106, 556-560.
- Ismail, S.B., Kumar, S.K., and Zain, R.B. (2007) Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci*, 49, 89-106.
- Jaeschke, R., Guyatt, G.H., and Sackett, D.L. (1994) Users's guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*, 271 (9), 703–707.
- Jeong, W.J., Paik, J.H., Cho, S.W., Sung, M.W., Kim, K.H., and Ahn, S.H. (2012) Excisional biopsy for management of lateral tongue leukoplakia. *J Oral Pathol Med*, 41 (5), 384-388.
- Katz, H.C., Shear, M., and Altini, M. (1985) A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. *J Oral Pathol*, 14, 476-482.
- Koch, F.P., Kunkel, M., Biesterfeld, S., and Wagner, W. (2011) Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity-a prospective and blinded study. *Clin Oral Investig*, 15 (5), 763-769.
- Kramer, I.R. (1980) Oral leukoplakia. *J R Soc Med*, 73 (11), 765-767.

- Kuffer, R., and Lombardi, T. (2002) Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol*, 38 (2), 125- 130.
- Kujan, O., Glenny, A.M., Duxbury, J., Thakker, N., and Sloan, P. (2005) Evaluation of screening strategies for improving oral cancer mortality: a Cochrane systematic review. *J Dent Educ*, 69 (2), 255-265.
- Kujan, O., Khattab, A., Oliver, R.J., Roberts, S.A., Thakker, N., and Sloan, P. (2007) Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol*, 43, 224–231.
- Las cifras del cáncer en España (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. ARCI: OMS; *Sociedad Española de Oncología Médica. GLOBOCAN 2012* [último acceso el 16/01/16]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- Lee, J.J., Hung, H.C., Cheng, S.J., Chiang, C.P., Liu, B.Y., Yu, C.H., Jeng, J.H., Chang, H.H., and Kok, S.H. (2007) Factors associated with under-diagnosis from incisional biopsy of oral leukoplakic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 104 (2), 217-225.
- Lin, H.P., Chen, H.M., Yu, C.H., Yang, H., Wang, Y.P., Chiang, C.P. (2010) Topical photodynamic therapy is very effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythroleukoplakia. *J Oral Pathol Med*, 39 (8), 624-630.

- Lingen, M.W., Kalmar, J.R., Karrison, T., Speight, P.M. (2008) Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol*, 44 (1), 10-22.
- Lodi, G., Scully, C., Carrozzo, M., Griffiths, M., Sugerman, P.B., Thongprasom, K. (2005) Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 100, 164-178.
- Lodi, G., Sardella, A., Bez, C., Demarosi, F., Carrassi, A. (2006) Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*, (4): CD001829.
- Manchanda, A., and Shetty, D.C. (2011) Reproducibility of grading systems in oral epithelial dysplasia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 17 (6), 935-942.
- Martorell-Calatayud, A., Botella-Estrada, R., Bagan-Sebastian, J.V., Sanmartin- Jimenez, O., Guillen-Barona, C. (2009) Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach. *Actas Dermosifiliogr*, 100 (8), 669-684.
- Matos-Cruz, R., and Bascones-Martínez, A. (2013) Biopsia por cepillado con el OralCDx®. Estado de la cuestión. *Av. Odontoestomatol*, 29 (3), 139-149.
- Mazul, A.L., Rodriguez-Ormaza, N., Taylor, J.M., Desai, D.D., Brennan, P., Anantharaman, D., Gheit, T., Tommasino, M., Abedi-Ardekani, B., Ols-han, A.F., and Zevallos, J.P. (2016) Prognostic significance of non-HP-

- V16 genotypes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 61, 98-103.
- McCullough, M., Jaber, M., Barrett, A.W., Bain, L., Speight, P., and Porter, S.R. (2002) Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol*, 38, 391–393.
- Mehrotra, R., Hullmann, M., Smeets, R., Reichert, T.E., and Driemel, O. (2009) Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med*, 38, 161-166.
- Mehrotra, R., Mishra, S., Singh, M., and Singh, M. (2011) The efficacy of oral brush biopsy with computer-assisted analysis in identifying precancerous and cancerous lesions. *Head & Neck Oncology*, 3, 39.
- Mendes, S.F., Oliveira-Ramos, G., Rivero, E.R., Modolo, F., Grando, L.J., and Meurer, M.I. (2011) Techniques for precancerous lesion diagnosis. *J Oncol*, 13, 1-5.
- Micó, J.M., Delgado, E., Berini, L., and Cosme, G. (2001) Liquen plano bucal: diagnóstico y tratamiento. *Quintessence*, 14 (4), 247-256.
- Mota-Ramirez, A., Silvestre, F.J., and Simó, J.M. (2007) Oral biopsy in dental practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12 (7), 504-510.
- Murata, P.J., Johnson, R.A., and McNicoll, K.E. (1990) Controlled evaluation of implementing the cytobrush technique to improve Papanicolaou smear quality. *Obstet Gynecol*, 75, 690-695.
- Napier, S.S., and Speight, P.M. (2008) Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*, 37 (1), 1-10.

- Panwar, A., Lindau, R., and Wieland, A. (2014) Management for premalignant lesions of the oral cavity, Expert Review. *Anticancer Therapy*, 14 (3), 349-357.
- Petti, S. (2003) Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*, 39 (8), 770-780.
- Phookan, J., and Saikia, K.P. (1998) A clinicopathological study of the pre-malignant conditions of oral cavity. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 50, 246-249.
- Poate, T.W.J., Buchanan, J.A.G., Hodgson, T.A., Speight, P.M., Barret, A.W., Moles, D.R., Scully, C., and Porter, S.R. An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in e specialist oral unit. *Oral Oncol*, 40, 829–834.
- Reddy, S.G., Kanala, S., Chigurupati, A., Kumar, S.R., Poosarla, C.S., and Reddy, B.V. (2012) The sensitivity and specificity of computerized brush biopsy and scalpel biopsy in diagnosing oral premalignant lesions: A comparative study. *J Oral Maxillofac Pathol*, 16 (3), 349-353.
- Reiborás-López, M.D., Pérez-Sayáns, M., Somoza-Martín, J.M., Gayoso-Diz, P., Barros-Angueira, F., Gándara-Rey, J.M., and García-García, A. (2012) Comparison of the Cytobrush®, dermatological curette and oral CDx ®brush test as methods for obtaining samples of RNA for molecular analysis of oral cytology. *Cytopathology*, 23 (3), 192-197.
- Reichart, P.A., Philipsen, H.P. (2005) Oral erythroplakia - a review. *Oral Oncol*, 41(6), 551-561.
- Rethman, M.P., Carpenter, W., Cohen, E.E., Epstein, J., Evans, C.A., Flaitz, C.M., et al. American Dental Association council on scientific affairs

expert panel on screening for oral squamous cell carcinomas. Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. *J Am Dent Assoc*, 141(5), 509-520.

Rubio-Colavida, J.M., Robledo-de-Dios, T., Llodra-Calvo, J.C., Simón-Salazar, F., Artazcoz-Oses, J., González-Andrés, V.L., García-Camba-de-la-Muela, J.M. (1997) Criterios mínimos de los estudios epidemiológicos de salud dental en escolares. *Rev Esp Salud Pública*, 71, 231-242.

Seijas-Naya, F., García-Carnicero, T., Gándara-Vila, P., Couso-Folgueiras, E., Pérez-Sayáns, M., Gándara-Vila, R., García-García, A., and Gándara-Rey, J.M. (2012) Applications of OralCDx® methodology in the diagnosis of oral leukoplakia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 17 (1), 5-9.

Seoane, J.M., González-Mosquera, A., Velo-Noya, J. (2008) La biopsia oral en el contexto del precáncer y del cáncer oral. *Av. Odontoestomatol*, 24 (1), 89-96.

Scheifele, C., Schmidt-Westhausen, A.M., Dietrich, T., Reichart, P.A. (2004) The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol*, 40, 824-828.

Sciubba, J.J. (1999) Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc*, 130, 1445–1457.

Sciubba, J.J. (2001) Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*, 2 (4), 239-251.

- Scully, C., and Carrozzo, M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 46, 15-21.
- Shafer, W.G., and Waldron, C.A. (1975) Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer*, 36, 1021-1028.
- Silverman, S., and Gorsky, M. (1997) Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 84, 154-157.
- Speight, P.M., Abram, T.J., Floriano, P.N., James, R., Vick, J., and Thornill, M.H. et al. (2015) Interobserver agreement in dysplasia grading: Towards an enhanced gold standard for clinical pathology trials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 120 (4), 474–482.
- Steele, T.O., and Meyers, A. (2011) Early detection of premalignant lesions and oral cancer. *Otolaryngol Clin North Am*, 44, 221-229.
- Trullenque-Eriksson, A., Muñoz-Corcuera, M., Campo-Trapero, J., Cano-Sánchez, J., and Bascones-Martínez, A. (2009) Analysis of new diagnostic methods in suspicious lesions of the oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 14(5), 210-216.
- van der Meij, E.H., and van der Waal, I. (2003) Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*, 32, 507-512.

- van der Meij, E.H., Schepman, K.P., and van der Waal, I. (2003) The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 96, 164-171.
- van der Waal, I. (2009) Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*, 45, 317-323.
- van der Waal, I. (2010) Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol*, 46, 423-425.
- Villa, A., Villa, C., and Abati, S. (2011) Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Aust Dent J*, 56, 253-256.
- Walsh, L.J., Savage, N.W., Ishiit, T., and Symour, G.J. (1990) Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*, 19, 389-396.
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N.W., van der Waal, I. (2007) Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, 36, 575-580.
- Warnakulasuriya, S., Reibel, J., Bouquot, J., and Dabelsteen, E. (2008) Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*, 37, 127-133.
- Warnakulasuriya, S. (2009) Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncolog*, 45, 309-316.



- Yang, S.W., Lee, Y.S., Chang, L.C., Hsieh, T.Y., and Chen T.A. (2015) Outcome of excision of oral erythroplakia. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 53 (2), 142-147.
- Yardimci, G., Kutlubay, Z., Engin, B., and Tuzun, Y. (2014) Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases*, 2 (12), 866-872.
- Yen, A.M., Chen, S.C., Chang, S.H., and Chen, T.H. (2008) The effect of betel quid and cigarette on multi-state progression of oral pre-malignancy. *J Oral Pathol Med*, 37 (7), 417-422.

ANEXOS

---

## 1. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA  
Hospital Clínico San Carlos  
Área 7 -Madrid-

Tel. 91.330 33 19/ Fax: 91.330 42 00  
e.mail: cetic.hcc@salud.madrid.org

### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

DÑA. M<sup>ª</sup> DEL MAR GARCÍA ARENILLAS, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID.

#### HACE CONSTAR:

Que el proyecto de investigación titulado "*Estudio de detección precoz de células cancerígenas oral CDX en el examen de la cavidad oral: aplicación a la clínica*", con código interno nº E-091285, del que es Investigador Principal el Dr. Antonio Bascones Martínez, de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité informa favorablemente sobre la realización de dicho proyecto.

Madrid, 7 de Junio de 2009



Fdo: Dra. Mar García Arenillas

## 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO



### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Estudio del test de detección precoz de displasia epitelial OralCDx® en el examen de lesiones orales potencialmente malignas: Aplicación clínica

*Investigadores:* Prof. Doctor Antonio Bascones Martínez, Rocío Díez Pérez, Ana Rita Campos Costa Matos Cruz

*Centro de Investigación:* Facultad de Odontología, Universidad Complutense de Madrid

Don/Dña.....de.....años  
de edad, con domicilio en.....y  
D.N.I. nº..... DECLARO que el Doctor/a, Don/ Dña.....  
.....

Me ha explicado que va a proceder, en un solo acto quirúrgico, a la toma de muestras, con fines de investigación para un proyecto llevado a cabo en la Facultad de Odontología de la UCM.

Comprendo que las muestras de la lesión serán realizadas mediante biopsia con el fin de obtener pequeños fragmentos de la lesión oral a analizar y para ello es necesario el uso de anestesia local.

Aunque se me hayan practicado los medios diagnósticos que se han estimado precisos, comprendo que pueden producirse procesos edematosos, inflamación, dolor o laceraciones en la mucosa yugal o la lengua que no dependen de la técnica empleada ni de su correcta realización, sino que son imprevisibles, en cuyo caso el facultativo tomará las medidas precisas, y continuará el procedimiento.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del procedimiento.

Y en tales condiciones CONSIENTO que se me practique la toma de muestras.

En.....

Fdo. EL ODONTÓLOGO.....

Fdo. EL PACIENTE.....

